

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-507240

(43) 公表日 平成11年(1999) 6月29日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

5/10

7/00

7/00

A 6 1 K 35/76

48/00

// A 6 1 K 35/76

48/00

C 1 2 N 5/00

B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 143 頁)

(21) 出願番号 特願平9-502258
 (86) (22) 出願日 平成8年(1996) 6月4日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 12月4日
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 6 / 1 0 2 4 5
 (87) 国際公開番号 W O 9 6 / 3 9 5 3 0
 (87) 国際公開日 平成8年(1996) 12月12日
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 4 6 2 , 0 1 4
 (32) 優先日 1995年6月5日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 5 4 9 , 4 8 9
 (32) 優先日 1995年10月27日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバー
 シテイ・オブ・ペンシルベニア
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州19104-
 3246 フィラデルフィア・サウスサード
 シックスストリート133
 (72) 発明者 ウイルソン, ジェイムズ・エム
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州19035グ
 ラドウイン・ノースアビニヨンドライブ
 1350
 (72) 発明者 ファイシャー, クリシュナ・ジェイ
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州19104フ
 イラデルフィア・パインストリート4006
 (74) 代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み換えアデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス、細胞株、並びに生産方法並びにその使用






(57) 【要約】

E 1 及び E 4 の両方の遺伝子領域を欠失した組み換えア
 デノウイルスの作成を可能にするアデノウイルス E 1 /
 E 4 を発現するパッケージング細胞株を提供する。調節
 配列の制御下の選択した導入遺伝子を含んでなる組み換
 え A A V に標的細胞を感染させることにより、標的細胞
 中への組み換え A A V の形質導入の効率を高めるための
 方法を提供する。感染した細胞を一本鎖組み換えウイル
 スのその二本鎖型への転化を促進する因子に接触させ
 る。

RECOMBINANT ADENOVIRUS AND ADENO-ASSOCIATED VIRUS, CELL LINES, AND METHODS OF PRODUCTION AND USE THEREOF**Publication number:** JP11507240 (T)**Publication date:** 1999-06-29**Inventor(s):****Applicant(s):** UNIV PENNSYLVANIA [US]**Classification:**

- international: C12N15/09; A61K35/76; A61K48/00; C12N5/10; C12N7/00; C12N15/35; C12N15/864; A61K48/00; C12N15/09; A61K35/66; A61K48/00; C12N5/10; C12N7/00; C12N15/34; C12N15/864; A61K48/00; (IPC1-7): A61K35/76; A61K48/00; C12N15/09; C12N5/10; C12N7/00

- European: C12N15/864A

Application number: JP19960502258T 19960604**Priority number(s):** WO1996US10245 19960604; US19950462014 19950605; US19950549489 19951027**Also published as:** WO9639530 (A2) WO9639530 (A3) US6261551 (B1) US6270996 (B1) EP0835321 (A2)

more >>

Abstract not available for JP 11507240 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9639530 (A2)**

An adenovirus E1/E4 expressing packaging cell line is provided, which permits the generation of recombinant adenoviruses deleted in both gene regions. A method for enhancing the efficiency of transduction of a recombinant AAV into a target cell is provided by infecting a target cell with a recombinant AAV comprising a selected transgene under the control of regulatory sequences. The infected cell is contacted with an agent which facilitates the conversion of single stranded recombinant virus to its double stranded form.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-507240

(43) 公表日 平成11年(1999) 6月29日

(51) IntCl. ⁹	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
5/10		7/00	
7/00		A 6 1 K 35/76	
// A 6 1 K 35/76		48/00	
48/00		C 1 2 N 5/00	B
		審査請求 未請求	予備審査請求 有 (全 143 頁)

(21) 出願番号 特願平9-502258
 (86) (22) 出願日 平成8年(1996) 6月4日
 (85) 翻訳文提出日 平成9年(1997) 12月4日
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 6 / 1 0 2 4 5
 (87) 国際公開番号 W O 9 6 / 3 9 5 3 0
 (87) 国際公開日 平成8年(1996) 12月12日
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 4 6 2 , 0 1 4
 (32) 優先日 1995年6月5日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 5 4 9 , 4 8 9
 (32) 優先日 1995年10月27日
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 ザ・トラステイズ・オブ・ザ・ユニバー
 シテイ・オブ・ペンシルベニア
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州19104-
 3246 フィラデルフィア・サウスサード
 シツクスストリート133
 (72) 発明者 ウイルソン, ジェイムズ・エム
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州19035グ
 ラドウィン・ノースアビニヨンドライブ
 1350
 (72) 発明者 フィシャー, クリシュナ・ジェイ
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州19104フ
 イラデルフィア・パインストリート4006
 (74) 代理人 弁理士 小田島 平吉 (外1名)
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組み換えアデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス、細胞株、並びに生産方法並びにその使用

(57) 【要約】

E 1 及び E 4 の両方の遺伝子領域を欠失した組み換えア
 デノウイルスの作成を可能にするアデノウイルス E 1 /
 E 4 を発現するパッケージング細胞株を提供する。調節
 配列の制御下の選択した導入遺伝子を含んでなる組み換
 え A A V に標的細胞を感染させることにより、標的細胞
 中への組み換え A A V の形質導入の効率を高めるための
 方法を提供する。感染した細胞を一本鎖組み換えウイル
 スのその二本鎖型への転化を促進する因子に接触させ
 る。

【特許請求の範囲】

1. (a) アデノ随伴ウイルスのゲノムの少なくとも一部であって、細胞分裂をしていない標的細胞中へ選択した遺伝子を形質導入することのできる部分のDNA、及び(b)発現を導く調節配列に適切に連結され、(a)のDNAに隣接し、そして標的細胞中で発現することのできる選択した遺伝子を含んでなる組み換えアデノ随伴ウイルスを提供し、該標的細胞を該組み換えアデノ随伴ウイルスに感染させ、該感染細胞を該ss組み換えウイルスのその二本鎖型への転化を促進する因子と接触させ、その場合、該転化が該標的細胞中で起こり、該標的細胞中への該組み換えウイルスの増大した形質転換をもたらす工程を含んでなるエクスピボでの標的細胞中への組み換えAAVの形質導入の効率を増大するための方法。

2. 該因子が、該一本鎖組み換えウイルスの二本鎖組み換えウイルスへの転化を増大することのできるポリペプチドまたはその機能的フラグメントをコードする選択した遺伝子を含んでなるヘルパーウイルスであり、該ヘルパーウイルスが細胞分裂をしていない標的細胞中へ該選択した遺伝子を形質導入することができる、請求の範囲1に記載の方法。

3. 該接触工程が該標的細胞を該ヘルパーウイルスに同時感染させことを含んでなる請求の範囲2に記載の方法。

4. 該ヘルパーウイルスがアデノウイルスである請求の範囲3に記載の方法。

5. 該選択した遺伝子がアデノウイルスE4遺伝子またはその機能的フラグメントである請求の範囲2に記載の方法。

6. 該アデノウイルスが2つの選択した遺伝子またはそれらの機能

的フラグメントを含み、該遺伝子がアデノウイルスE4遺伝子及びE1遺伝子である、請求の範囲2に記載の方法。

7. 該E4遺伝子の該機能的フラグメントがE4の読み枠6を含んでなる請求の範囲5または6に記載の方法。

8. 該組み換えアデノ随伴ウイルスが、さらに二番目に選択した遺伝子の発

現を導くことのできる調節配列に適切に連結された該第二の遺伝子を含んでなり、該第二の遺伝子が発現時に該一本鎖組み換えウイルスのその二本鎖型への転化を促進することができ、そして標的細胞中で該第一の選択した遺伝子と同時発現することができ、それにより第二の遺伝子産物が標的細胞中で発現され、その場合、該転化が該標的細胞中で起こり、該標的細胞中に該組み換えウイルスの増大した形質導入をもたらす、請求の範囲1に記載の方法。

9. 該第二の遺伝子の発現を導く調節配列が誘導性プロモーターを含んでなり、そして該第二の遺伝子の発現が誘導因子の存在下で起こる、請求の範囲8に記載の方法。

10. (a) アデノ随伴ウイルスのゲノムの少なくとも一部であって、細胞分裂をしていない標的細胞中へ少なくとも2つの選択した遺伝子またはそれらの機能的フラグメントを形質導入することのできる部分のDNA、(b) 発現を導く調節配列に適切に連結された第一の選択した遺伝子、(c) 発現を導くことのできる調節配列に適切に連結された第二の選択した遺伝子を含んでなり、該第二の遺伝子が発現時に該一本鎖組み換えウイルスのその二本鎖型への転化を促進することができ、該第一及び該第二の遺伝子が(a)のDNAに隣接し、該第一及び第二の遺伝子が標的細胞中で同時発現することができる、組み換えアデノ随伴ウイルス。

11. 該第二の遺伝子がアデノウイルスE4遺伝子、E4のORF6及びこれらの機能的フラグメントからなる群から選択される請求の範囲10に記載の組み換えウイルス。

12. 該第二の遺伝子がアデノウイルスE1遺伝子またはその機能的フラグメントである請求の範囲10に記載の組み換えウイルス。

13. 該第二の遺伝子の発現を導く調節配列が誘導性プロモーターを含んでなり、そして該第二の遺伝子の発現が誘導因子の存在下で起こる請求の範囲10に記載の組み換えウイルス。

14. さらに(d) 発現を誘導することのできる調節配列に適切に連結された付加的な選択した遺伝子を含んでなり、該付加的な遺伝子及び該第二の遺伝子が

該第二及び付加的な遺伝子の両方の発現時に該一本鎖組み換えウイルスのその二本鎖型への転化を一緒に促進することができ、該第一、第二及び付加的な遺伝子が(a)のDNAに隣接し、そして標的細胞中で同時発現することができる、請求の範囲10に記載の組み換えウイルス。

15. 該第二の遺伝子がアデノウイルスE4遺伝子またはその機能的フラグメントであり、そして該付加的な遺伝子がアデノウイルスE1遺伝子またはその機能的フラグメントである、請求の範囲14に記載の組み換えウイルス。

16. 該E4の機能的フラグメントがORF6配列である請求の範囲15に記載の組み換えウイルス。

17. 該付加的な遺伝子の発現を導く調簡配列が誘導性プロモーターを含んでなり、そして該付加的な遺伝子の発現が誘導因子の存在下で

起こる、請求の範囲15に記載の組み換えウイルス。

18. 請求の範囲10から16までの組み換えアデノ随伴ウイルスを提供し、標的細胞を該組み換えウイルスに感染させ、そして該標的細胞中での該選択した遺伝子の発現を可能にする条件下で該感染細胞を培養し、該転化が該標的細胞中で起こり、該標的細胞中での該組み換えウイルスの増大した形質導入をもたらす工程を含んでなる該標的細胞中への組み換えAAVの形質導入の効率を増大するための方法。

19. 請求の範囲17の組み換えアデノ随伴ウイルスを提供し、標的細胞を該組み換えウイルスで感染させ、そして該標的細胞中で該第二または付加的な遺伝子の発現を誘導する誘導因子に該標的細胞を接触させ、該転化が該評価細胞中で起こり、該標的細胞中での該組み換えウイルスの増大した形質導入をもたらす工程を含んでなる該標的細胞中への組み換えAAVの形質導入の効率を増大するための方法。

20. 組み換えアデノ随伴ウイルス及び標的細胞中で該ss組み換えウイルスのその二本鎖型への転化を促進する因子を含んでなる製薬学的組成物。

21. 該ウイルスが請求の範囲10-16の組み換えウイルスからなる群から選択される請求の範囲20に記載の組成物。

22. 該ウイルスが請求の範囲17の組み換えウイルスであり、そしてさらに該組み換えウイルス中の該第二または付加的な遺伝子の発現を誘導する誘導因子を含んでなる請求の範囲20に記載の組成物。

23. 請求の範囲10-17の組み換えアデノ随伴ウイルスで形質導入した哺乳類細胞。

【発明の詳細な説明】**組み換えアデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス、細胞株、並びに生産
方法並びにその使用**

本発明は、国立衛生研究所助成番号HD32649-01、DK47757及びDK49136により援助された。米国政府は、本発明に権利を有する。

発明の分野

本発明は、一般的に、体細胞遺伝子治療に、そしてより具体的には、遺伝子疾患の治療において有用な方法及び組成物に関する。

発明の背景

アデノウイルスは、様々な細胞型へ治療的またはレポーター導入遺伝子を効率よく運ぶように改変することができる真核生物のDNAウイルスである [例えば、M. S. Horwitz等、「Adenoviridae and Their Replication」、Virology、第二版、1712頁、ed. B. N. Fields等、Raven Press Ltd.、New York (1990)を参照]。組み換えアデノウイルス (rAd) は、細胞分裂の状態にかかわらず実質的に全ての細胞型へ非常に高いレベルの導入遺伝子の運搬を提供することができる。遺伝的不均衡を補う治療的導入遺伝子をインビボで運ぶことにおけるこの系の有効性は、様々な疾患の動物モデルで示されている [K. F. Kozarsky等、Somatic Cell Mol. Genet.、19:449-458 (1993) (「Kozarsky等I」): K. F. Kozarsky等、J. Biol. Chem.、269:13695-13702 (1994) (Kozarsky等

II) 等]。インビボでの肝細胞中への遺伝子の形質導入における組み換えアデノウイルスの使用は、以前に齧歯類及びウサギにおいて示されている [例えば、上に引用したKozarsky II及びS. Ishibashi等、J. Clin. Invest.、92:883-893 (1993)を参照]。

遺伝子治療のために開発された第一世代の複製能力を欠く組み換えアデノウイルスは、全E1a及びE1b領域の一部の欠失を含む。この複製能力を欠くウイ

ルスは、トランスに作用するE1aタンパク質を提供する機能的なアデノウイルスE1a遺伝子を含んでいるアデノウイルスで形質転換した相補性ヒト胚腎臓細胞株、293細胞[ATCC CRL 1573]中で増殖する。E1を欠失したウイルスは、E1a及びE1b領域の遺伝子産物をトランスに与える293細胞中で複製し、そして感染性ウイルスを生産することができる。得られたウイルスは、多数の細胞型に感染することができ、そして導入された遺伝子を（それ自身のプロモーターを保有する場合）発現することができるが、非常に高い感染多重度で細胞を感染させなければ、E1領域DNAを保有しない細胞中で複製できない。

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、体細胞遺伝子治療のための遺伝子運搬媒体としての使用を提案されているヒトDNAに組込むパルボウイルスである[B. J. Carter, 「Handbook of Parvoviruses」中、ed.、P. Tijsser, CRC Press、155-168頁(1990)]。この小さい非エンベロープウイルスは、rep及びcapと呼ばれる調節及びキャプシド遺伝子群をコードする4.6kbの一本鎖(ss)DNAゲノムを含む。Re

pポリペプチド(rep78、rep68、rep62及びrep40)は、AAVゲノムの複製、レスキュー及び組込みに関与する。capタンパク質(VP1、VP2及びVP3)は、ウイルス粒子のキャプシドを形成する。145bpの逆末端反復(ITRs)が、rep及びcapの読み枠に5'及び3'末端で隣接し、この最初の125bpはYまたはT形の二重構造を形成することができる。

ITRに含まれる必要なシス成分を保持しながら全てのウイルスの読み枠を治療的ミニ遺伝子で置き換えることにより、AAVの組み換え型(rAAV)がベクターとして開発されている[例えば、米国特許番号第4,797,368号；第5,153,414号；第5,139,941号；第5,252,479号；及び第5,354,678号；並びに1991年11月28日に公開された国際公開番号WO第91/18088号；1993年12月9日に公開されたWO第

93/24641号及び1994年6月23日に公開されたWO第94/13788号を参照]。しかしながら、遺伝子治療のための形質導入媒体としてAAVを確立するための進展は、様々な理由のために遅れている。例えば、組み込まれるプロウイルスは、染色体19の特定の部位を優先的に標的とする。加えて、複製能力を欠く組み換え体の大規模な生産が困難である。rAAVを生産するために用いる細胞は、必要なヘルパー機能を与えるためにアデノウイルスまたはヘルペスウイルスと共に感染されなければならない、このことにより培養物中の混成するウイルスから組み換えAAV(rAAV)を精製することにおける問題が生じる。培養物中のヘルパーウイルスでの同時感染からAAVを精製するにつれて、rAAVが示す遺伝子形質導入効率が下がるので、遺伝子治療ベクターとしての精

製した組み換えAAVでの実際の実験は期待外れであった。

さらなる組み換えアデノウイルス及びrAAV、遺伝子治療による疾患及び疾病の治療におけるこれらの組み換えウイルスの効果的な使用を可能にする治療的組成物及び方法に対して、当該技術分野における必要性が依然として存在する。

発明の要約

本発明の一つの特徴として、アデノウイルス遺伝子E1a、E1b及びE4、またはこれらの機能的フラグメント、例えばE4の読み枠(ORF)6を発現するパッケージング細胞株を提供する。

他の特徴として、本発明は、E1及びE4遺伝子領域の機能的欠失を有するアデノウイルスのゲノムの少なくとも一部のDNA、発現を導く調節配列に適切に連結された適当な遺伝子及びアデノウイルスキャプシドを含んでなるrAdを提供し、このrAdは哺乳類の細胞に感染し、そしてインビボまたはインビトロでその細胞中で遺伝子産物を発現することができる。本発明は、上記のrAdで感染させた哺乳類の細胞も提供する。

さらに他の特徴として、本発明は、E1及びE4遺伝子領域の機能的欠失を有するアデノウイルスのゲノムの少なくとも一部のDNAを含んでなるシャトルベクターを提供する。

さらなる特徴として、本発明は、上記の組み換え A d を生産するための方法及び上記の組み換え A d を用いて哺乳類細胞中へ選択した遺伝子を運搬するための方法を提供する。

他の特徴として、本発明は、標的細胞への組み換え A A V の形質導入の効率を高めるための方法を提供する。簡潔に言えば、発現を導く調節

配列に適切に連結された導入遺伝子を含んでなる s s 組み換えアデノ随伴ウイルス (r A A V) で標的細胞を感染させ、そして s s r A A V のその二本鎖 (d s) 型への転化を促進する因子に感染細胞を接触させることにより、この方法は機能する。s s r A A V の d s r A A V への転化が標的細胞中で起こり、標的細胞への r A A V の増大した形質導入をもたらす。この因子は、s s r A A V の d s r A A V への転化を増大することのできるポリペプチドをコードする選択した遺伝子またはその機能的フラグメントを保有し、そして同じ標的細胞に同時感染するヘルパーウイルスであることができる。因子はまた、同じ機能を達成し、そして感染した標的細胞に適応される薬剤または化学的組成物であることもできる。この方法は、エクスピボ環境及びインピボの両方で機能することができる。

さらに他の特徴として、本発明は、遺伝的疾患または疾患の治療における使用を意図する導入遺伝子及び誘導性または構成的調節配列に適切に連結された少なくとも一つの付加的な遺伝子の両方を含む新規な組み換え A A V を提供する。付加的な遺伝子は、発現すると、単独でまたは他の付加的な遺伝子と一緒に s s r A A V のその d s 型への添加を促進することのできるポリペプチドをコードする。好ましい態様において、付加的な遺伝子は、アデノウイルス E 4 またはその機能的フラグメントである。また、標的細胞中への新規な r A A V の形質導入の効率を高めるための方法も開示される。

本発明の新規な r A A V 及び方法は、遺伝性疾患、癌及び他の遺伝的機能障害を治療するためのエクスピボ及びインピボでの遺伝子治療処置プロトコルで使用するための製薬学的組成物においても有用である。

本発明の他の特徴及び利点は、その好ましい態様の以下の詳細な説明においてさらに記述される。

図面の簡単な説明

図1は、ヒトE4 ORF6遺伝子配列を制御するそれぞれMMTVまたはヒツジMTプロモーター、成長ホルモン遺伝子のターミネーター配列(GH)、SV40 ori、neo^R遺伝子を含んでいるpBR322に基づくプラスミド配列、SV40ポリA部位及びamp^R遺伝子を含む典型的なプラスミドpMME4ORF6 [配列番号1] またはpMTE4ORF6の概要図である。

図2は、示した制限エンドヌクレアーゼ酵素部位を有するrAd H5.001 CBLacZ [配列番号3] の図式地図である。縞のある棒はCBLacZミニ遺伝子を表し、黒い棒はAd5ウイルスバックボーンを表し、網状線の棒はAdE4欠失を表す。

図3は、H5.001 CBLacZで感染したE4補足細胞株に対するLacZ形成単位(LFU)/ml対時間(時間)を表す。

図4Aは、LFU/mlの単位の感染後(pi)24時間での収量及びORF6タンパク質(abs. mm)対誘導因子デキサメタゾンの濃度(μ M)を表している、293-27-18パッケージング細胞における誘導、ORF6発現及びウイルス生産のグラフである。Abs. mmは、ウェスタンブロットにおけるタンパク質バンドの大きさの強度であり、mm²単位の吸収及びタンパク質の大きさを反映する。四角は、感染後24時間での収量である。ひし形は、感染後24時間で検出されたORF6タンパク質である。

図4Bは、パッケージング細胞が293-10-3細胞であることを

除いて、図4Aのものと同様のグラフである。記号は、図4Aに記述されたようである。

図5Aは、感染したHeLa細胞からのライセート中の β -ガラクトシダーゼ酵素活性を表す棒グラフである。水平軸は、rAAV、AV. CMV L⁺lacZに対するアデノウイルスの添加を示している記号「+」と共にHeLa細胞へ感染させたアデノウイルスを示す。垂直軸は、ONPGを用いた細胞内の β -ガラク

トシダーゼの比活性 (mUnit/mgタンパク質) を示す。各棒の下に、A V. CMV LacZ ベクターのみを与えられた細胞に対する比活性の誘導倍率を示す。

図5Bは、rAAVで同時感染したHeLa細胞における野生型Ad5またはE2突然変異体d1802のAd感染多重度(MOI)対細胞内 β -ガラクトシダーゼ比活性を表している棒グラフである。実施例11を参照。

図6Aは、実施例12によりwtAd5及びrAAVで感染したHeLa細胞に対して、 β -ガラクトシダーゼの比活性及び分当たりのカウント(CPM)が垂直軸に沿って表され、そしてアデノウイルスMOIが水平軸上にあるグラフである。低いMOI(1、5及び10)感染から得られたデータが示される。

図6Bは、細胞をAd突然変異体d1802で感染させたことを除いて図6Aのものと同様のグラフである。

図7Aは、Repの存在下(+Rep)またはRepの非存在下(-Rep)での相補的なAAV鎖のリーディング鎖合成のためのモデルを示す。Repは、閉じた末端を有する二重構造を開いた末端の二重構造に転化することができる末端分解活性を発現する。Repの非存在下で

は、共有結合的に閉じたヘアピン構造を元のまま残して末端の分解が正常に機能しない。レスキューされたdsAAVゲノムの両方の鎖がウイルス粒子にパッケージされるので、これらの条件下でヘアピンは左側及び右側に見いだされると期待される。

図7Bは、AAV ITR、CMV即時型初期エンハンサー/プロモーター(CMV)、SV40スプライス供与体-スプライス受容体(SD/SA)、大腸菌 β -ガラクトシダーゼcDNA(LacZ)及びSV40ポリAシグナル(pA)を含む標識した領域を有する直鎖状AV. CMV LacZの概要図である。bp位置1035及び4509に位置する2個のNotI部位が示される。

図7Cは、rAV. CMV LacZの閉じた末端及び開いた末端のフラグメントを示す。

図7D、7E及び7Fは、末端分解なしにssAV. CMV LacZの位置

4509でのNot I消化により生じた、開いた末端の及び共有結合的に閉じた二重構造フラグメントの混合物を示す。Not I 4509消化は、ハイブリダイゼーション標的（すなわち、SV40 pA）に関連して、右のITRを含む361bpフラグメントを遊離する簡便な方法を提供する。末端分解があると、開いた末端の361bpフラグメントのみがそのような消化により生じると予想される（図7D）。

図8Aは、AVCMV LacZで形質導入した細胞株293（MT-ORF6）に対する、 β -ガラクトシダーゼの比活性（mUnit/mgタンパク質）対増加する濃度の亜鉛（ μ M）誘導因子（各棒の下第一列）を表す棒グラフである。293細胞に対する誘導倍率（各棒の下第二列）及び亜鉛の非存在下で維持した293（ORF6）細胞に対す

る誘導倍率（第三列）も与えられる。

図8Bは、rAAVの二重構造モノマー複製分子型（RFm）のCPM对各棒の下に誘導のために用いた亜鉛の濃度（ μ M）及び0mM亜鉛中で維持した293（ORF6）細胞に対する誘導倍率を表す棒グラフである。

図8Cは、AV. CMV LacZ形質導入効率を表す誘導特性の図式的な比較である。図8Aからの比活性データ及び図8BからのAV. CMV LacZ RFmのCPMデータが垂直軸に沿って表され、そして実験中に用いた硫酸亜鉛の濃度が水平軸に沿って示される。

図9は、硫酸亜鉛誘導因子の非存在下または50、100、150、200もしくは250 μ Mの硫酸亜鉛誘導因子の存在下で1,000 AV. CMV LacZ ウイルス粒子/細胞のMOIで形質導入したHeLa（MT-ORF6）細胞に対して、比活性（ミリユニット β -ガラクトシダーゼ/mgタンパク質）対誘導のために用いた亜鉛の濃度（水平軸下第一列）、HeLa細胞に対する誘導倍率（第二列）及び亜鉛の非存在下で維持したHeLa（MT-ORF6）細胞に対する誘導倍率（第三列）を表す棒グラフである。

図10は、プラスミドpAV. CMV LacZ [配列番号4]の概要図である。

図11は、プラスミドpAV. CMVALP. GRE-ORF6 [配列番号5]を示す。

発明の詳細な説明

本発明は、E1及びE4遺伝子の両方を機能的に欠失した組み換えアデノウイルス(rAd)の生産を可能にするパッケージング細胞株を提

供する。そのようなrAdでの疾患の治療的処置を可能にするこれらのrAd及び方法が開示される。体細胞遺伝子治療プロトコルにおける発現用導入遺伝子を含んでいる組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)の形質導入効率を高めるための新規な「第二世代」rAAV及び方法も提供される。本発明の方法及び組成物は、骨髓移植の前の骨髓細胞の望ましい造血幹細胞プロジェニター遺伝子での形質導入のような遺伝子治療のエキスピボでの応用において有用である。本発明の態様は、嚢胞性線維症のような遺伝的疾患の患者における望ましい遺伝子の形質導入を含む、遺伝子治療ベクターによる患者の直接的なインピボ治療のための製薬学的組成物においても有用である。

I. パッケージング細胞株

導入遺伝子の受容量を増し、そしてrAdの免疫反応を減少するために、できるだけ多くのウイルス遺伝子をアデノウイルスを不活性化するために欠失しなければならない。しかしながら、そのような欠失Adの構築及び増殖のための補足細胞株を作成することは難しい。本発明の方法及び組成物は、第一世代のE1欠失アデノウイルスに対して遺伝子治療において以前同定されたいくつかの問題を克服し、そして特に筋肉組織への投与に利点を示す。

Ad血清型5の初期領域4(E4)は、ウイルスDNAの複製、宿主細胞の遮断及び後期mRNAの蓄積に関与すると考えられる7個のORFからなる。E4を欠失したrAdを作成するためには、ヘルパーウイルスまたはパッケージング細胞株により、E4領域の機能がrAdに提供されなければならない。しかしながら、機能するAd E1及び機能的なE4の単一の細胞株における連続した発現は、通常、細胞に対して

有毒であるので、有用なパッケージング細胞株はこれまで利用できないでいる。従って、そのような細胞は、r A d の増殖及び複製のために有用ではない。さらに、機能的な A d E 1 及び A d E 4 遺伝子をコードしている DNA は、パッケージング細胞株中に存在する場合、r A d ウイルスとの組み換えの機会を増し、ウイルスの野生型 A d ウイルスへの復帰を引き起こす可能性がある。

本発明は、A d 5 E 1 遺伝子及び A d 5 E 4 遺伝子の O R F 6 のみを含むパッケージング細胞株を提供することにより、これらの問題を回避する。E 4 の O R F 6 のみで、ウイルスの生活環における E 4 に対する要件を提供することができる。

本発明によると、O R F 6 は、好ましくは、誘導性プロモーターの転写制御下にある。グルココルチコイド、特にデキサメタゾンにより誘導できるマウス乳癌ウイルス (M M T V) プロモーターが現在好ましい。M M T V プロモーターの D N A 配列は、配列番号 1 のヌクレオチド 1-1506 に及ぶ。他の誘導性プロモーターは、亜鉛により誘導できるヒツジメタロチオニン (M T) プロモーターである [M. G. P e t e r s o n 等、E u r. J. B i o c h e m.、174: 417-424 (1988)]。しかしながら、M T プロモーターの硫酸亜鉛誘導因子は、それ自体が細胞に対して有毒である可能性がある。1995年5月18日に開示され、本明細書の参考文献に含まれる国際特許出願 W O 第 95/13392 号において同定されたもののような他の誘導性プロモーターもまた、本発明のパッケージング細胞株の生産に用いることができる。構成的 A d 5 E 4 領域プロモーター、V T R のような構成的プロモーターを O R F 6 の発現の制御に用いることができる。

誘導性プロモーターを利用する本発明のパッケージング細胞株は、E 4 O R F 6 遺伝子の発現を調節することにより毒性の発生を制御することを可能にする。A d 配列を含んでいる適切なシャトルベクターを細胞株にトランスフェクトした後、E 4 O R F 6 の発現を適当な誘導因子により誘導することができる。従って、パッケージング細胞は、細胞が有毒になる前に、r A d の生産的な感染及び回復を可能にするのに十分な期間 r A d に対して A d E 1 及び A d E 4 O

R F 6の両方の遺伝子産物を提供することができる。現在のところ、細胞が毒性を感じる前の期間は約10日である。

最も好ましい形態において、パッケージング細胞株は、誘導性プロモーターの制御下のE 4 O R F 6配列を導入するヒト胚腎臓(H E K) 2 9 3 E 1発現細胞株である。当該技術分野の熟練した者は、選択したアデノウイルス血清型のE 1 a、E 1 b及びE 4 O R F 6遺伝子を発現する新規な細胞株の作成のために他の親細胞株を選択することができることを理解するはずである。そのような親細胞株の中に、H e L a [C C L 2]、A 5 4 9 [C C L 1 8 5]、K B [C C L 1 7]、D e t r o i t [例えば、D e t r o i t 5 1 0、C C L 7 2]及びW I - 3 8 [A T C C C C L 7 5]細胞を含むことができる。これらの細胞株は、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n、1 2 3 0 1 P a r k l a w n D r i v e、R o c k v i l l e、M D、U S Aから全て入手できる。他の適当な親細胞を他の供給者から入手することができる。そのような親細胞を改変のために選択する場合、例えば、適当なプロモーター下にE 1 a及びE 1 b遺伝子またはそれらの機能的フラグメントを含んでいるプラスミドでのトラ

ンスフェクションによるようにこれらの遺伝子機能を、並びに本明細書に記述したようにO R F 6遺伝子を、その細胞株にさらに供給する必要がある。

実施例1は、A d 5 E 4領域のO R F 6のみ、または機能的な比較のために全E 4領域を含んでいるパッケージング細胞株の構築を教示する。簡潔に説明すれば、A d 5 E 4遺伝子の全E 4領域及びO R F 6配列が既知の技術[例えば、S a m b r o o k等、「M o l e c u l a r C l o n i n g. A L a b o r a t o r y M a n u a l.」、第二版、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y、N e w Y o r k (1989)及びその中に引用された参考文献を参照]により得られる。O R F 6領域を単離するために、固定(anchored)P C R技術がO R F 6配列をその開始コドンから終止コドンまでを増幅するために用いられた。O R F 6の開示された配列から選択したプライマーが、O R F 配列及びその配列の末端への挿入制限部位を増幅するために用いられ

た。E 4 O R F 6 配列それ自体は、配列番号 1 のヌクレオチド 1 5 2 3 から 2 4 0 8 までとして再生される。全 E 4 遺伝子配列は、A d 5 のジーンバンク配列 [ジーンバンク登録番号 M 7 3 2 6 0] に開示されている。

選択したプロモーターの制御下に O R F 6 配列を配置するミニ遺伝子が構築された。本明細書に用いられる「ミニ遺伝子」は、発現される適切な配列（この特別な例において、O R F 6 配列）及びそのミニ遺伝子を含有する細胞中でその適切な配列を転写し、遺伝子産物を発現するために必要な他の調節成分の組み合わせを意味する。O R F 6 配列遺伝子は、その転写を可能にするように調節成分に適切に連結される。そのよ

うな成分は、O R F 6 発現を導くプロモーターのような通常の調節成分を含む。ある誘導性プロモーターは、 Zn^{2+} 誘導性 M T プロモーターであり、またあるものは、配列番号 1 のデキサメタゾン誘導性 M M T V プロモーターであった。

ミニ遺伝子はまた、転写物の効率よいポリ A 付加のために必要なシグナルを与える配列（ポリ-A または p A）を含む、O R F 6 ウイルス配列と異種起源の核酸配列も含む。本発明に用いられる一般的なポリ-A 配列は、成長ホルモン（G H）遺伝子ターミネーター配列由来のものである（配列番号 1 のヌクレオチド 2 4 0 9 - 3 6 5 4）。ポリ-A 配列は、通常、O R F 6 配列に続いてミニ遺伝子に挿入される。実施例 1 に記述した M M T V - O R F 6 ミニ遺伝子に用いられたポリ A 配列 [配列番号 1] は、G H 遺伝子ターミネーター及び S V 4 0 複製起点（o r i）により与えられる。当該技術分野の熟練した者は、E 4 O R F 6 配列をシャトルプラスミドに移すために、プロモーター配列、ポリ A 配列及び／または S V 4 0 o r i の異なる同じようなミニ遺伝子も考案することができる。これら及び他の一般的なベクター成分の選択は慣例であり [例えば、上に引用した S a m b r o o k 等及びその中に引用された参考文献を参照]、多くのそのような配列を商業的及び工業的供給者から、並びにジーンバンクから入手できる。

O R F 6 を含んでいるミニ遺伝子は、ネオマイシン耐性遺伝子を含む p B R 3 2 2 に基づくシャトルプラスミド中にサブクローン化され、図 1 のシャトルベクターを生じた。多数の既知のバクテリアシャトルベクターのいずれでも、そのベ

クターがレポーター遺伝子または多数、例えば、ネオマイシン、アンピシリンまたはプリマイシンが当該技術分野に

において既知である選択可能なマーカーを含むなら、ミニ遺伝子を保有するために用いることができる。当該技術分野の熟練した者は、プラスミドでトランスフェクトした細胞の染色体中にORF6ミニ遺伝子を同様に導入することができる、他のプラスミド成分を用いた他の適当なシャトルベクターを開発することができると思われ。

実施例1においてさらに説明するように、他のシャトルベクターが比較の目的のために考案され、これは内因性E4プロモーターの存在下または非存在下で構成的レトロウイルスMLVLTR配列の制御下の完全なまたは実質的に完全なAd5E4領域を含む。ORF6ミニ遺伝子（または全E4領域）を保有するシャトルプラスミドが、AdE1遺伝子産物を発現するHEK293細胞中に導入された。これらのAdE4またはORF6遺伝子をそれらの内因性プロモーターまたは異種起源の誘導性プロモーターのいずれかから発現する補足細胞株が作成された。これらの細胞株は、それらの遺伝的構成、E4タンパク質合成、組み換えAAVヘルパー機能、H5d11004ウイルスの相対的ブランク効率及び組み換えE1/E4欠失アデノウイルスの増殖反応速度論によりさらに特徴づけられる。典型的なE1/E4発現パッケージング細胞株のこれらの特性は、以下の実施例において詳細に説明される。

II. 組み換えアデノウイルス

E1/E4発現細胞株は、哺乳類の細胞及び組織へ適当な遺伝子を運ぶことができるE1/E4欠失rAdの構築において有用である。これらのrAdは、少なくともE1a、E1b及びE4Ad遺伝子領域を機能的に欠失する。「機能的に欠失する」という用語は、遺伝子領域がもはや遺伝子発現産物を生産できないように、例えば突然変異または改

変により、その遺伝子領域のかかなりの量が除去されるまたはそうでなければ損傷を受けることを意味する。必要な場合、全遺伝子領域を除去することができる。

パッケージング細胞株中で増殖した r A d を用いたインビボ実験において、E 1 / E 4 欠失 r A d は、特に筋肉細胞へ導入遺伝子を導入することにおける有用性を示した。

シャトルベクター、必要な場合ヘルパーウイルス、及び r A d の構築に用いられるアデノウイルス配列、並びに本明細書に記述したベクター及びウイルスの構築に用いられる他の成分及び配列を、以前に開示され、記述された配列に基づき商業的または学究的供給者から容易に入手することができる。ウイルス材料も個々の患者から入手することができる。当該技術分野の熟練した者が既知であり、そして行っている標準的な組み換え分子クローニング技術と一緒に、本明細書に含まれる教示及び参考文献を用いてウイルス配列及びベクター成分を作成することができる。配列の欠失、挿入及び本明細書により教示される他の突然変異を含む、ベクターを形成している存在する核酸配列の改変を標準的な技術を用いて作成することができる。同様に、ベクター、「ミニ遺伝子」のクローニング及び構築、並びに適切なウイルスシャトルベクターへのその挿入及び組み換え感染性ウイルスの生産に有用なウイルス配列の選択のために用いる方法は、本明細書に提供される教示を与えられれば、当該技術分野の技術の範囲内である。

A. 導入遺伝子の構築

この文脈において「ミニ遺伝子」は、このミニ遺伝子の成分がエクスビボまたはインビボで遺伝子産物を発現するために設計されることを除いて上のように定義される。そのような成分は、r A d でトランスフェ

クトした細胞中で導入遺伝子の発現を導くために必要な通常の調節成分を含む。このミニ遺伝子のために、選択したプロモーターが導入遺伝子に適切に連結され、そして他の調節成分と共に組み換えベクターの選択したウイルス配列内に配置される。プロモータの選択は通常のことであり、本発明の制限ではない。有用なプロモータは、構成的プロモーターまたは調節された（誘導性）プロモータであることができ、これらは発現される導入遺伝子の量を制御することができる。例えば、望ましいプロモーターは、サイトメガロウイルス（CMV）即時型初期プロモーター／エンハンサー [例えば、B o s h a r t 等、C e l l、41: 52

1-530 (1985) を参照] のものである。他の望ましいプロモーターは、ラウス肉腫ウイルスLTRプロモーター／エンハンサーを含む。さらに他のプロモーター／エンハンサー配列は、ニワトリ細胞質 β -アクチン(CB)プロモーター [T. A. Kost 等、Nucl. Acids. Res.、11 (23) : 8287 (1983)] である。当該技術分野の熟練した者は、他の適当なプロモータを選択することができる。

ミニ遺伝子は、望ましくは、上記のように、ポリ-A配列並びに機能的なスプライス供与体及び受容体部位を有するイントロンを含む、ウイルスベクター配列と異種起源の核酸も含むことができる。ポリ-A配列は、通常、導入遺伝子配列の後でそして3' アデノウイルス配列の前でミニ遺伝子に挿入される。本発明のミニ遺伝子は、望ましくはプロモーター／エンハンサー配列及び導入遺伝子の間に配置されるイントロンも含むことができる。これらの及び他の一般的なベクター成分の選択は上記のように慣例であり、そして多くのそのような配列を商業的及び工業

的供給者から、並びにジーンバンクから入手できる。

上に記述したように、ミニ遺伝子は、rAd中のあらゆる選択した欠失の部位に配置される。E1/E4欠失rAdH5.001CB LacZにおいて、導入遺伝子は欠失したE1遺伝子領域に配置される。しかしながら、要求されるように、導入遺伝子をアデノウイルス配列の他の場所に配置することができる。

B. 組み換えアデノウイルスの生産

本発明に有用なアデノウイルス配列は、ジーンバンクから入手できる型Ad5 [ジーンバンク登録番号M73260] を含む多数のアデノウイルス型のDNA配列を含むことができる。血清型2、3、4、7、12及び40のような、そしてさらに現在同定されている41種のヒト型 [例えば、上に引用したHorwitzを参照] を含む、あらゆる既知のアデノウイルス血清型からアデノウイルス配列を得ることができる。同様に、他の動物に感染することが知られているアデノウイルスも本発明のベクター構築物に用いることができる。アデノウイルス型の選択は、以下の本発明を制限すると予想されない。様々なアデノウイルス株が

American Type Culture Collection、Rockville、Marylandから入手でき、または様々な商業的及び研究所の供給者から請求により入手できる。以下の典型的な態様において、アデノウイルス型5（Ad5）が便宜上用いられる。

しかしながら、異なるヒトアデノウイルス血清型に基づく様々なアデノウイルスシャトルベクターを得ることが望ましい。細胞性及びおそらく体液性免疫を回避し、そして導入遺伝子発現の期間を延長し、並びに繰り返された治療的処置の結果を向上するための治療的投薬計画におい

て、そのようなプラスミドのライブラリー及び得られたrAdは有用であると予想される。加えて、様々な血清型の使用は、異なる組織標的特異性を有するrAdを生産すると考えられる。さらに、本発明のrAdにおけるアデノウイルス遺伝子E1及びE4の欠如は、E1遺伝子のみを欠失したrAdの破壊を通常引き起こす不都合なCTL反応を減少または除去するはずである。

本発明のrAdは、E4遺伝子領域も完全にまたは機能的に欠失した、組み換えの欠損（すなわち、E1欠失）を有するアデノウイルスである。E4遺伝子領域の機能的な欠失を、他のアッセイの中で実施例2及び3のアッセイにより評価することができる。本発明に有用なrAdは、場合によっては、E2a遺伝子領域に他の突然変異、例えば温度感受性（ts）突然変異及びE3遺伝子領域に欠失を有することができる。

本発明のアデノウイルスは、（mu1.3ないし4.5に及ぶ）アデノウイルス初期即時型初期遺伝子E1a及び（mu4.6ないし11.2に及ぶ）遅延型初期遺伝子E1bの機能的な欠失を含む。同様に、このアデノウイルスは、（mu9.2ないし97.2に及ぶ）全E4領域のまたはE4領域の少なくともORF6の機能的な欠失を有する。本発明のE1/E4欠失rAdにおいて場合によっては欠失することができる遺伝子領域は、（mu76.6ないし86.2に及ぶ）アデノウイルス遅延型初期遺伝子E3の全てまたは一部を含む。E3の機能は、rAdの機能及び生産に無関係である。

本発明のrAdは、アデノウイルスタンパク質の減少した発現及び／または減

少ししたウイルス複製をもたらす突然変異も有することができる。例えば、(mu 67.9ないし61.5に及ぶ) アデノウイルス遅延型

初期遺伝子E2a中にts突然変異を導入することができる。そのような突然変異の中に、Ad5H5ts125株[P. Vander Vilet等、J. Virol.、15:348-354(1975)]において62.5muで見いだされた(DBP)E2a領域におけるミスセンスts突然変異の取り込みを含む。この株のE2a遺伝子から生産される72kdタンパク質のカルボキシ末端(62.5mu)での単一のアミノ酸置換は、ssDNA結合タンパク質であり、アデノウイルスゲノムDNAの複製に関与するタンパク質産物を生じる。許容温度(約32℃)では、このts株はHeLa細胞中で完全な生活環増殖ができ、一方、非許容温度(約38℃)ではアデノウイルスDNAの複製が見られない。加えて、非許容温度では、HeLa細胞中に減少した免疫反応性の72kdタンパク質が見られる。例えば、J. F. Engelhardt等、Hum. Gene Ther.、5:1217-1229(1994); J. F. Engelhardt等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91:6196-6200(1994)及び1995年5月18日に開示され、引用することにより本明細書に取り込まれる国際特許出願WO第95/13392号を参照。

しかしながら、当該技術分野または他において以前記述されたようなアデノウイルスゲノムにおける他の欠失もまた、本発明のrAdに生じることができると理解されなければならない。rAdの一つの最小型は、全てのウイルス遺伝子を欠失したアデノウイルスゲノム配列を含むことができる。より詳細には、このアデノウイルス配列は、(oriとして働く)アデノウイルスのシスに作用する5'及び3'逆方向末端反復(ITR)配列、並びに直鎖状のAdゲノムをパッケージングするために必要な配

列及びE1プロモーターのためのエンハンサー成分を含む天然の5'パッケージング/エンハンサー領域のみであることが可能である。5' ITR及びパッケー

ジング／エンハンサー領域（A d 5 m u 0-1またはb p 1-360）を含んでいるアデノウイルス5'配列を、本発明のr A dの5'アデノウイルス配列として用いることができる。アデノウイルスゲノムの約b p 35, 353-末端または地図単位～98.4-100に及ぶアデノウイルスゲノムの右末端（3'）I T R配列を含んでいる3'アデノウイルス配列を、望ましくはr A dの3'配列として用いることができる。E 1及びE 4遺伝子を明らかに欠いているこれらの配列は、r A dのミニ遺伝子に隣接またはこれと適切に結合することができる。次に、あらゆる他の必要なA d遺伝子産物が、本発明のヘルパーウイルス及びE 1／E 4 O R F 6発現パッケージング細胞により供給される。

本発明における使用のための典型的なr A dを、例えば、遺伝子治療用途のための他のr A dを作成するために一般的に用いられている技術である、様々なr A dからの適切なフラグメントの相同組み換えにより得ることができる。以下の実施例において、代表的なr A d、H 5. 001 C B L a c Zは、アデノウイルスd 11004（H 5 d 11004でもある）ウイルスバックボーン及びp A d C B L a c Zミニ遺伝子D N A間の相同組み換えにより構築される。H 5 d 11004は、地図単位約92.1から地図単位98まで、すなわち実質的に全E 4遺伝子を欠失したA d 5ウイルスである。d 11004ウイルスは、B r i d g e及びK e t n e r、J. V i r o l.、632（2）：631-638（1989年2月）に記述されている。

p A d C B L a c Zベクターは、A d m. u. 0-1、以下に記述するような他の調節成分と共に、ニワトリβ-アクチンプロモーターの制御下にバクテリアのβ-ガラクトシダーゼ遺伝子が挿入され、そしてA d m. u. 9-16が隣接するE 1欠失、及びプラスミド配列を含んでいるc D N Aプラスミドである。

本発明のパッケージング細胞株における本発明のE 1／E 4 r A dの生産は、通常の技術を利用する。そのような技術は、指定研究書〔上に引用したS a m b r o o k等〕に記述されたような通常のクローニング技術、アデノウイルスゲノムの重複するオリゴヌクレオチド配列の使用、P C R及び適切なヌクレオチド配列を与えるあらゆる適当な方法を含む。標準的なトランスフェクション及び同

時トランスフェクション技術、例えば、相補性293細胞株を用いたCaPO₄トランスフェクション技術を用いる。用いる他の常法は、ウイルスゲノムの相同組み換え、寒天オーバーレイにおけるウイルスのプラーク形成、シグナル発生を測定する方法などを含む。

例えば、適切なミニ遺伝子を含むプラスミドベクターpAdCBLacZの構築及び組み立ての後、本発明のE1/E4発現パッケージング細胞株をヘルパーウイルスH5dl1004で感染させる。次に、この感染細胞株を続いて常法によりアデノウイルスプラスミドベクターでトランスフェクトする。E4を欠失したH5dl1004ヘルパー及びpAdCBLacZベクターの間で相同組み換えが起こり、これはベクター中のアデノウイルス導入遺伝子配列が複製され、そしてウイルス粒子キャプシド中にパッケージングされることを可能にし、rAdを生じる。トランスフェクト後約30またはそれ以上の時間で、細胞を集め、

抽出物を調製し、そしてLacZ導入遺伝子を含んでいるrAdをCsCl勾配中の浮遊密度超遠心により精製する。

III. 遺伝子治療における組み換えウイルスの使用

上記のようにアデノウイルスベクター及びE4を欠失したヘルパーウイルス及びパッケージング細胞株の協力により生産される導入遺伝子を含んでいるrAdは、インビボまたはエクシボで製薬学的組成物中の導入遺伝子を患者へ運び、そして哺乳類細胞中へのその遺伝子の組み込みを与えることのできる効率よい遺伝子導入媒体を提供する。

rAdは、遺伝子治療のために常法でヒトに投与され、そして導入遺伝子が向けられる疾患に対する代わりのまたは補足的な遺伝子治療として働く。本発明のrAdを、好ましくは、生物学的に適合する溶剤または製薬学的に受容しうる運搬賦形剤中に懸濁して患者に投与することができる。適当な賦形剤は滅菌食塩水を含む。製薬学的に受容しうる担体であることが知られ、そして当該技術分野の熟練した者によく知られている他の水性及び非水性の等張滅菌注入溶剤、並びに水性及び非水性の滅菌懸濁剤をこの目的のために用いることができる。

rAdは、適切な標的細胞、例えば、筋肉、肝臓、上皮等をトランスフェクト

し、そして医学の当該技術分野の熟練した者が決定することのできる過度に不都合でないまたは医学的に受容しうる生理学的効果を有して治療利益を提供するのに十分なレベルの導入遺伝子の導入及び発現を与えるために十分な量で投与される。通常のそして製薬学的に受容しうる投与経路は、筋肉または他の選択した細胞への直接運搬、鼻内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、経口及び他の非経口投与経路を含む。要求される場合、投与経路を組み合わせることができる。

r A dの服用量は、主に、治療される状態、患者の年齢、体重及び健康のような因子により決まり、従って患者間で変わる可能性がある。例えば、r A dの治療的に有効なヒト服用量は、通常、約 1×10^9 から 1×10^{11} p f u/mlまでの濃度のウイルスを含んでいる食塩水溶液の約20から約100mlまでの範囲である。好ましいヒト服用量は、 2×10^{10} p f u/mlで約50mlの食塩水溶液であると概算される。服用量は、あらゆる副作用と治療利益を比較検討して調整される。投与の頻度を決定するために導入遺伝子の発現レベルを調べることができる。

場合によっては、方法工程は、r A dの投与と同時にまたはその前もしくは後のいずれかに適量の短時間作用形の免疫調節剤を患者へ共投与することを含む。選択される免疫調節剤は、本明細書において、本発明の組み換えベクターに対して誘導される中和抗体の形成を阻止することができる、またはベクターの細胞溶解性Tリンパ球（CTL）除去を阻止もしくは実質的に遅らせることのできる因子として定義される。望ましい免疫調節剤の中には、インターロイキン-12 [欧州特許出願番号第441, 900号] ; γ -インターフェロン [S. C. Morris等、J. Immunol.、152:1047 (1994)] ; インターロイキン-4 [米国特許番号第5, 017, 691号] ; 抗-OKT³⁺ [例えば、米国特許番号4, 658, 019号を参照] または抗体GK1. 5 (ATCC受託番号TIB207) のようなCD4タンパク質に対する抗体 ; 可溶性CD40分子またはCD40リガンドに対する抗体 (Bristol-Myers Squibb Co) [1993年8月18日に公開された欧州特許出願第555, 880号] ; B7の可溶性形またはCD28もしくはCTLA4に対する抗

体 [CTLA4-I

g (Bristol-Myers Squibb Co)、1994年7月20日に公開された欧州特許出願606, 217号]、あるいはシクロスポリンAまたはシクロホスファミドのような薬剤がある。従って、本発明の製薬学的組成物及び方法は望ましい遺伝子治療処置を提供する。

IV. 組み換えアデノ随伴ウイルス

以下の文脈において、「導入遺伝子」という用語は、目的のポリペプチドまたはタンパク質をコードする、AAV配列と異種起源の核酸配列またはその逆転写産物を意味する。導入遺伝子の転写ができるように導入遺伝子を調節成分に適切に連結することができ、すなわち、プロモーター並びにSV40イントロンまたはポリA配列のような導入遺伝子の調節のために有用な他の調節配列と適切に結合して導入遺伝子を配置する。導入遺伝子のその調節配列との合成結合物を本明細書においてミニカセットまたはミニ遺伝子という。

導入遺伝子またはミニカセット配列の組成は、得られるrAAVが用いられる用途による。例えば、導入遺伝子配列の一つの型は、発現すると検出できるシグナルを生じるレポーター配列を含む。そのようなレポーター配列は、制限を含まずに、大腸菌 β -ガラクトシダーゼ (LacZ) cDNA、アルカリホスファターゼ遺伝子 (ALP) 及び緑色蛍光タンパク質遺伝子を含む。これらの配列は、発現を導く調節成分と結合した場合、常法、例えば、紫外線波長吸収、目に見える色の変化などにより検出できるシグナルを与える。

導入遺伝子配列の他の型は、宿主細胞において適切な遺伝子産物を発現する治療的遺伝子を含む。これらの治療的核酸配列は、典型的に、先天性または非先天性の遺伝的欠損を置換または修正する、あるいは後成

的な疾患または疾病を治療するためにインビボまたはエクスビボで患者に投与されそして発現する産物をコードする。当該技術分野の熟練した者は、そのような導入遺伝子を容易に選択することができ、そしてrAAVへの挿入のための導入遺伝子またはミニカセットの設計は本発明の制限ではない。

「r A A V」という用語は、1996年5月9日に公開された国際公開特許出願番号WO第96/13598号に記述されたA d A A Vハイブリッドウイルスを含む、先行する技術のあらゆる組み換えA A V遺伝子治療媒体を包含する。より詳細には、r A A Vは、(a) A A Vのゲノムの少なくとも一部で、細胞分裂なしに少なくとも一つの選択した遺伝子を標的細胞中へ形質導入することができる部分のDNA、(b) (a)のDNAに隣接し、そしてインビボまたはインビトロで標的細胞中で発現できる、発現を導く調節配列に適切に連結された少なくとも一つの選択した遺伝子（または導入遺伝子）を含んでなるr A A Vを定義する。

他のr A A Vは、当該技術分野において記述されている。本発明の方法は、最小で5'及び3'の両方のA A V逆末端反復が存在すれば、r A A Vにおいて用いられるA A V配列の厳密な性質により制限されない。従って、当該技術分野の熟練した者はr A A Vを選択することができ、r A A V自体は本発明における制限ではない。本明細書に特に開示されるr A A Vは、具体的に説明するためのものである。

「形質導入」という用語は、本発明の実施により生産されるr A A Vが、適切な標的細胞に感染し、そして細胞の機構を利用することにより細胞中で導入遺伝子を発現することができることを意味する。形質導入

は、ウイルスDNAを標的細胞の染色体中へ安定に組み込むことを含むことができる。「増大した形質導入」は、アデノウイルスまたはヘルペスウイルスヘルパーで同時感染した培養物中で生産され、そしてそれから精製された典型的な先行する技術のr A A Vより高い効率で、インビトロ、エクスピボまたはインビボのいずれかで、転化因子の存在下で標的細胞に形質導入するr A A Vの能力として定義される。

この方法は、遺伝子治療のためのr A A Vが介在する細胞の形質導入における制限する工程が、ssウイルスゲノムの内在化または導入ではなく、むしろそれに続く一本鎖(ss)ウイルスゲノムの転写的に活性のある二本鎖(ds)型への転化であるという所見に基づく。ds DNA中間体の形成は、組み換え遺伝

子発現のために必要であり、これは転写後の機構を通してウイルス及び細胞の因子により調節されると思われる。本発明者等は、この律速段階を克服し、それにより r A A V の形質導入能力を、そして最終的に遺伝子治療プロトコルにおける r A A V の使用を増大する方法を考案した。

本発明のこの方法は、慣例的に調製された導入遺伝子を含む s s r A A V を用いることができる。先行する技術は、ヘルパーのアデノウイルスまたはヘルペスウイルスを培養物に同時感染させ、続いてヘルパーウイルスを含んでいる培養混成物から r A A V を精製し、そして r A A V だけで標的細胞を感染することにより、s s r A A V を生産する。本発明は、s s r A A V で標的細胞を感染することを提供する。しかしながら、いったん標的細胞が感染すると、その感染細胞を r A A V の d s 型への s s r A A V の転化を促進する因子と接触させる。この「促進因子」または「転化因子」の作用は、標的細胞において s s から d s

への転化が起こることを引き起こし、標的細胞中への組み換え A A V の増大した形質導入をもたらす。標的細胞中で s s から d s r A A V への転化を促進することにより、本発明の方法は、形質導入及び該宿主細胞の染色体中への r A A V の安定な染色体組込みの両方をもたらすこともできる。

好ましくは、本発明の使用のために、「促進または転化因子」は、いくつかの形態を取ることができる。

A. 転化因子がヘルパーウイルスである。

一つの態様において、因子はヘルパーウイルスであり、その方法は、標的細胞をヘルパーウイルスに感染させる付加的な工程を含む。この方法に有用なヘルパーウイルスは、s s r A A V の d s r A A V への転化を促進することができる選択した遺伝子を含む。選択した遺伝子は、転化を増大する遺伝子産物またはポリペプチド（または全長のポリペプチドの生物学的活性を共有するポリペプチドの機能的フラグメント）をコードすることができる。代わりに、選択した遺伝子は、通常 r A A V の s s から d s への転化を防ぐ細胞の遺伝子を阻止または阻害するように細胞中で働くアンチセンスまたはリボザイムを発現することができる。これらの遺伝子を以下に記述する第二世代 r A A V に用いることもできる。

ヘルパーウイルスは、細胞分裂していない標的細胞中で選択した遺伝子産物を発現することができる。ヘルパーウイルスは、野生型または突然変異体のアデノウイルスであることができる。ヘルパーウイルスは、代わりに、野生型または突然変異体のヘルペスウイルスであることができる。好ましくは、促進因子としての使用のために、そのようなウイル

スは、ヘルパーウイルス及び／またはそれらの発現した遺伝子産物が患者において疾病を引き起こさないようにいくつかの正常な遺伝子を欠失した突然変異体である。

例えば、本発明において有用なヘルパーアデノウイルスは、単一のアデノウイルス初期遺伝子の遺伝子産物のみを発現することができる。ssrAAVがAd初期遺伝子産物にさらされることは、形質導入効率の同等の増加を伴ってdsrAAVゲノムの形成を実質的に増大するのに十分である。この効果を生じるのに有用なAd初期遺伝子は、E1、E2a、E4及びこれらの機能的フラグメントである。しかしながら、以下の実施例により示されるように、アデノウイルスは、アデノウイルスのE1及びE4遺伝子の発現に依存し、そしてrAAVのds複製分子型の出現に直接比例するように、インビトロで組み換えAAV形質導入を実質的に増大する。

ヘルパーウイルスの一つの例は、野生型の初期遺伝子の大部分を欠失し、そしてE4遺伝子またはその機能的フラグメントのみを標的細胞中で発現することのできるアデノウイルスである。そのような機能的フラグメントの中にE4遺伝子のORF6がある。実施例において以下に記述するように、細胞株における実験は、アデノウイルスE4遺伝子座のORF6がrAAV形質導入を顕著に増大するのに十分であることを示す。アデノウイルスのE4-ORF6の選択的な発現は、E1及びE4遺伝子産物の組み合わせにさらすことにより生じたものに比較して、類似するが、いくぶん減じられた形質導入効率の増加を伴う。すなわち、E4のORF6産物はrAAV形質導入の増加を高めるのに十分であるが、この効果は、E1遺伝子産物により実質的に増幅される。

従って、より好ましくは、発現された E 1 及び E 4 遺伝子産物の両方に r A A V をさらすことが、上記の律速工程の実質的な増大をもたらす。従って、他の典型的なヘルパーウイルスは、発現すると s s から d s への転化を促進する一つ以上の遺伝子を含むこともできる。そのようなヘルパーウイルスの例は、E 1 及び E 4 遺伝子の両方またはこれらの機能的フラグメントを発現するアデノウイルスである。ウイルスが、標的細胞を提供する患者において疾病を引き起こさないように十分に損なわれるなら、さらに他の A d 遺伝子をヘルパーウイルスにより発現することができる。

s s の d s r A A V への転化を促進する因子がヘルパーウイルスである場合、本発明の方法は、r A A V 及びヘルパーウイルスに標的細胞を同時感染させることを含んでなる。そのような同時感染は、エクスピボ治療、すなわち、患者から抽出した細胞に対して行われる操作で、これらの細胞はこの方法が行われた後に患者に再び挿入される、に関連して起こることができる。代わりに、常法により 2 種のウイルスに患者を直接同時感染させることができる。2 種のウイルスの患者への運搬を特定の器官または一般的な循環系に向けることができる。そのような運搬法は、例えば嚢胞性線維症の遺伝子治療に対して当該技術分野において記述されている [例えば、米国特許番号 5, 2 4 0, 8 4 6 号を参照]。

B. 転化因子が化学薬品、薬剤または r A A V 形質導入を活性化できる他の存在である。

本発明の方法の他の態様において、r A A V に感染させた細胞に接触させる転化因子を以下の種類の既知の化合物または方法、1) ヒドロキシウレア、過酸化水素のような DNA 合成のインヒビター及び DNA ポ

リメラーゼの他の直接または間接のインヒビター、2) シクロホスファミド、アルキル化剤、プリン類似体、例えば 6-チオグアニン等のような DNA 損傷を引き起こす化学療法剤、3) トポイソメラーゼ、DNA リガーゼ、エキソヌクレアーゼ及びエンドヌクレアーゼのインヒビターのような DNA 改変酵素を妨害する薬剤、及び 4) 酪酸ナトリウムのような非特異的に転写を増大する因子または D M S O のような細胞を安定化する因子から選択することができる。また、発癌物

質のような遺伝子に有毒な因子を転化因子として用いることもできる。照射のような物理的方法を含む、DNAに分断または損傷を引き起こす他の方法もまた、rAAVのssからdsへの転化を促進することができる因子として有用であることができ、そしておそらく当該技術分野の熟練した者はこれらを選択することができる。これらの種類の化合物及び方法は、ssからds rAAVへの転化をもたらすと考えられる。

本発明の方法のこの態様により、rAAVはまた慣例的に生産されるが、ヘルパーウイルスと同時に感染されない。ss rAAVに標的細胞を感染させ、そして感染した細胞を因子の特質により適切な方法で因子に接触させる。細胞への直接添加により、これらの転化増大因子をrAAVに感染した標的細胞のエキスビボ治療に用いることができる。そのような添加は、rAAV遺伝子治療媒体の添加と同時にまたは連続して起こることができる。例えば、感染した標的細胞の上に挙げた化合物または薬剤の一つに適切な期間供することができる。当該技術分野の熟練した者は、感染細胞を因子に接触させるためのパラメーターを容易に決定することができる。これらのパラメーターは、この方法をエキスビボまたはインビボのいずれで行うかによる。例えば、処理されるエキスビ

ボの感染細胞の数が、投与量及びそのような処理のタイミングのために考慮される。

同様に、患者の身体の状態がインビボで患者へ因子を運搬するパラメーターを決定することができる。従って、当該技術分野の熟練した者は、服用量及び損傷因子の量を調整することができる。因子がヒトまたは動物における使用を認められた典型的な化学治療剤である場合、その因子、すなわち化学療法剤及びrAAV遺伝子治療媒体を患者に同時投与することにより、rAAVのそのような増大した転化がインビボでも起こることができる。本発明のこの特徴により、化学療法剤は、rAAVが投与される時にのみ投与される。化学療法剤及び組み換え遺伝子治療媒体の適切な服用量及び量、並びにそのような量を決定するための方法は、当該技術分野の技術の範囲内である。しかしながら、化学療法剤の効果はrAAVのssからdsへの転化を増大し、従って標的細胞中への形質導入の効率

を増大するので、薬剤及び r A A V のいずれかまたは両方の通常の服用量より低い服用量を効率よく投与することができると予想される。

C. 転化因子は r A A V の一部であることができる。

本発明のさらに他の態様において、導入遺伝子及び転化因子の両方が標的細胞中で同時に発現されるように、新規な「第二世代」 r A A V をウイルス中に転化因子を組み込むように設計することができる。そのような新規な組み換えアデノ随伴ウイルスは、以下の成分、

(a) アデノ随伴ウイルスのゲノムの少なくとも一部で、細胞分裂していない標的細胞中へ少なくとも2つの選択した遺伝子またはこれらの機能的フラグメントを形質導入することのできる部分のDNA、(b)

第一の選択した遺伝子、すなわち、発現を導く調節配列に適切に連結された所望する導入遺伝子及び(c)第二の選択した遺伝子、すなわち、該第二の遺伝子の発現を導くことのできる調節配列に適切に連結された「転化遺伝子」を含んでなる。「転化遺伝子」は、発現時に、s s r A A V のその d s 型への転化を促進できる。この r A A V 中の第一及び第二の遺伝子は、A A V DNA、好ましくは5'及び3' I T R に隣接する。そのような第二世代 r A A V の態様は、図11に図式的に与えられる。そのDNA配列は、配列番号5に与えられる。

そのような新規な r A A V の他の態様は、発現時に、標的細胞中で s s から d s r A A V への転化を促進する能力を有する一つ以上の遺伝子を含むことができる。例えば、上記の新規な r A A V は、発現を導くことのできる調節配列に適切に連結された付加的な選択した遺伝子を含むことができ、その付加的な遺伝子及び上記の該第二の「転化」遺伝子は、第二及び付加的な遺伝子の両方の発現時に、s s r A A V のその d s 型への転化と一緒に促進することができる。この r A A V において、3つの遺伝子全て、すなわち、導入遺伝子、第二の「転化」遺伝子及び付加的な遺伝子は A A V DNA に隣接する。

新規な r A A V の一つの望ましい態様において、A A V I T R は選択した導入遺伝子及びアデノウイルス E 4 遺伝子またはその機能的フラグメント（例えば、O R F 6 配列）である転化遺伝子に隣接する。他の態様において、新規な組み

換え体は、3つの遺伝子、導入遺伝子、アデノウイルスE 4 遺伝子またはその機能的フラグメント及びアデノウイルスE 1 遺伝子またはその機能的フラグメントを発現する。導入遺伝子と共に標的細胞中で発現されたE 1 及びE 4 遺伝子産物は、r A A Vのs

s のd s 型への転化を促進するように一緒に作用する。

新規なr A A V及びその使用のさらに他の態様において、例えば、転化遺伝子が単一の第二の遺伝子であろうとまたは一つより多い付加的な遺伝子であろうと、その発現を導く調節配列は誘導性のプロモーターを含むことができる。従って、転化遺伝子の発現は、誘導因子の存在下でのみ起こる。多数の誘導性プロモーター及びコンパニオン誘導因子、例えば、グルココルチコイドのようなステロイドが当該技術分野に知られており、そしてこの記述を用いて当該技術分野の熟練した者は、本発明のr A A V及び方法に組み込むためにこれらを容易に選択することができる。

少なくとも一つの「転化遺伝子」を保有するそのような「第二世代」のr A A Vを用いる本発明の方法は、このs s r A A Vで標的細胞を感染させることを提供する。導入遺伝子及び転化遺伝子の両方の発現を導くプロモーターが構成的である場合、感染した標的細胞機構が導入遺伝子産物及び転化遺伝子産物の発現を導く。導入遺伝子及び「転化遺伝子」の標的細胞中での同時発現は、さらなる方法工程なしに、その細胞中でのs s r A A Vのd s r A A Vへの転化を促進し、そして形質導入効率及びおそらく安定な染色体組込みを増加する。

この方法に用いる第二世代r A A Vが誘導性プロモーターの制御下に「転化遺伝子」を含む場合、この方法はわずかに改変される。r A A Vによる標的細胞の感染後に、誘導性プロモーターが転化遺伝子産物の生産を「始める」ことを引き起こす適当な誘導因子に感染した標的細胞を接触させる。誘導因子が除去または停止されると、転化遺伝子産物の発現は「止まる」。

上記のように、遺伝子治療のための導入遺伝子を含んでいるあらゆる先行する技術のr A A Vを上の方法の少なくとも一つの態様において用いることができる

。上記の新規な r A A V を含む r A A V を作成するための様々な成分の供給源、選択及び組み立てはすでに慣例であり、そして本明細書に含まれる開示を与えられれば、当該技術分野の熟練した者は容易に達成できる。そのような方法は通常の遺伝子工学技術 [例えば、上に引用した S a m b r o o k 等を参照] を用いる。

本発明の新規な r A A V ウイルス及び方法は、体細胞遺伝子治療のための効率よい遺伝子導入媒体を提供し、そしてエキスピボでの用途及びインビボでの使用のための製薬学的組成物に適している。本明細書に記述される r A A V 及び方法を用いることにより、r A A V が、例えば、代表的な r A A V、A V、C M V L a c Z において示された L a c Z 導入遺伝子の場所に治療的遺伝子を含む場合、その治療的導入遺伝子をインビボまたはエキスピボで患者へ運ぶことができ、標的細胞中への適切な遺伝子の効率よい形質導入及びおそらく安定な組込みを与える。従って、本明細書に記述されるこれらの新規な r A A V 及び方法を遺伝的欠損または障害を修正するために用いることができる。A A V がそのゲノムを非分裂細胞中へ効率よく組込む能力は、造血幹細胞のエキスピボ形質導入に基づく遺伝子治療の開発において現在利用されている。r A A V のインビボでの用途は、伝達気道の最終的に分化した上皮細胞に形質導入するために精製したウイルスのストックを気道中に注入する、C F の治療のために主に開発されている。本明細書に記述する方法及び組成物を遺伝子治療の両方の型で用いることができる。そのような使用のために適した他の状態は、家族性高コレステロール血症の治療のための低

密度リポタンパク質 (L D L) レセプター遺伝子の肝細胞中への形質導入を含む。当該技術分野の熟練した者は、これら及び他の疾患の治療のために上の方法により用いることができる多数の r A A V を作成することができる。

エキスピボまたはインビボ治療に対して、生物学的に適合した溶剤または製薬学的に受容しうる運搬賦形剤中にウイルス粒子を懸濁することにより、r A A V を標的細胞を感染するために用いることができる。適当な賦形剤は滅菌食塩水を含む。製薬学的に受容しうる担体であることが知られ、そして当該技術分野の熟

練した者によく知られている他の水性及び非水性の等張滅菌注入溶剤並びに水性及び非水性の滅菌懸濁剤をこの目的のために用いることができる。

r A A Vは、適切な細胞をトランスフェクトし、そして医学の当該技術分野の熟練した者が決定することができる、過度に不都合でないまたは医学的に受容しうる生理学的効果を有する治療的利益を与えるのに十分なレベルの選択した導入遺伝子の発現を与えるために十分な量で投与される。インビボ投与の通常のそして製薬学的に受容しうる経路は、標的器官、組織または部位への直接運搬、鼻内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、経口及び他の非経口投与を含む。要求される場合、投与の経路を組み合わせることができる。

この方法の感染工程のためのr A A Vの服用量は、主に、治療的環境、すなわちエクスピボまたはインビボ、治療される状態、選択した遺伝子、患者の年齢、体重及び健康のような因子により決定され、従って、患者間で変わる可能性がある。エクスピボ治療のための治療的に効果のあるr A A Vの服用量は、約1から約10までの間の形質導入粒子／細胞の

範囲にあると思われる感染多重度に基づく。本発明によるインビボ感染のための治療的に有効なr A A Vのヒト服用量は、約 1×10^7 から 1×10^{10} 形質導入粒子／mlの濃度のウイルスを含んでいる約20から約50mlまでの食塩水溶液の範囲にあると考えられる。好ましいヒト服用量は、上の濃度で約20mlの食塩水溶液である。服用量は、あらゆる副作用と治療的利益を比較検討して調整される。服用量投与の選択、調整または頻度を決定するために、選択した遺伝子の発現のレベルを調べることができる。

投与される促進因子の有効量は、決定する当該技術分野の技術の範囲内であり、そして因子の特質による。上記の化学薬品及び製薬のある種の既知の服用量を、DNAに損傷を与え、そしてr A A Vのssからdsへの転化を促進するこの方法に用いることができる。因子がヘルパーウイルスにより発現される遺伝子である場合、感染するウイルスの量は、r A A Vに対して上に記述した量と同様でなければならない。もちろん、因子が第二世代r A A V中に存在する遺伝子である場合、r A A Vに対して上に記述した同一の服用量が適用される。

本発明の上記の方法のいくつかの態様は、肺及び肝臓の両方へのrAAVが介在する遺伝子導入のネズミのモデルにおいて確かめられた。これらの実験は、rAAVによるインビボでの同様に低いレベルの遺伝子導入を示し、これは、E1及びE4を発現するアデノウイルスでの同時感染により数桁の大きさ増加された。

要約すると、アデノウイルスが培養細胞においてrAAV形質導入を増大することを示すために実験が行われた。E1欠失ウイルスで同時感染した293細胞において作られたLacZ組み換えAAVの生産及び

特性化の間に、ライセートからのrAAVの精製が、293細胞においてアッセイした場合にLacZ形質導入活性のかかなりの喪失と関連することが見られた。rAAV活性のこの減少は、残余の混成しているヘルパーアデノウイルスが熱による不活性化により除去される最終工程において特に明らかであった。LacZ形質導入活性は、rAAVの精製したストックにアデノウイルスを戻して加えることにより回復された。これらのデータは、アデノウイルスがrAAVの形質導入効率を実質的に増大できることを初めて示した。

実施例10に記述するように、異なるアデノウイルス初期遺伝子突然変異体をAV. CMV LacZと呼ばれる精製したLacZ rAAVと混合することにより、一連の相補性群を作成した（実施例2を参照）。これらの特定したウイルスの混合物をHeLa細胞においてLacZ形質導入に関して分析した（実施例12及び13を参照）。E1欠失rAd H5、CBALP及びE4欠失突然変異体d11004は、AV. CMV LacZの形質導入の顕著な増加を与えなかった（図5A）。しかしながら、より少ない重大な欠失を有するE1及びE4突然変異体で部分的な活性を達成することができた。d1110（E1B-55kDa欠失）及びd11010（ORF6欠失）の両方が、陽性の青色細胞の数に関してAd5、ts125及びd1802のものに匹敵するレベルまで形質導入を増大したが、全β-ガラクトシダーゼ活性はかなり低かった（図5A）。これらの結果は、rAAV形質導入の増大に初期領域E1及びE4を結び付ける。

以下に記述する実験も、転化遺伝子としてE4のようなAd遺伝子を含む新規

な r A A V が、ヘルパーウイルスの非存在下で r A A V の形質

導入効率を増加することができることを示す。以下の実施例 15 においてより詳細に記述するように、293 細胞が E 4 に広がる A d 5 のゲノムフラグメントで安定にトランスフェクトされた。この E 1 / E 4 発現細胞株及び親の E 1 発現細胞株 (293) を r A A V で感染させ、形質導入に関して分析した。これらの実験は、r A A V 形質導入のアデノウイルスが介在する増大における E 1 及び E 4 (O R F 6) の合わせた発現の重要性を示した。

E 1 及び E 4 発現の存在下で、r A A V 形質導入は d s R F モノマー及びダイマーの出現を常に伴った (実施例 14)。重要なことには、r A A V ベクター形質導入及び二重構造型の蓄積の間の密接な相互関係を、2つの異なる実験環境、すなわち、E 1 / E 4 発現アデノウイルスで感染した細胞 (図 8 A 及び 8 B) または補足細胞株 (図 8 C) において得ることができた。

以下の実施例は、新規なパッケージング細胞株の構築及び試験、本発明の E 1 / E 4 欠失 r A d 及びその使用、本発明の遺伝子治療のための改善した方法及び第二世代組み換え A A V 生産を例示する。これらの実施例は、具体的説明のためだけに提供し、本発明の範囲を制限しない。

実施例 1 - 新規な E 1 a / E 1 b 及び E 4 発現パッケージング細胞株

A. E 4 O R F 6 発現プラスミドの構築

A d 5 からの全 E 4 領域または O R F 6 ミニ遺伝子を、ネオマイシン耐性遺伝子を含むシャトルプラスミド中にサブクローン化した。プロモーター成分が異なる 2 種の O R F 6 ミニ遺伝子を開発した。第一のものは、O R F 6 発現を導くために Z n ¹² 誘導性ヒツジメタロチオネイン (MT) プロモーターを用いた。第二のものは、デキサメタゾン誘導性

マウス乳癌ウイルス (M M T V) プロモーターを用いた。

本発明のパッケージング細胞株の構築のために有用な典型的なプラスミドは、p M M T V E 4 O R F 6 である。このプラスミドに含まれるミニ遺伝子は、配列番号 1 に配置され、そしてヒト E 4 O R F 6 遺伝子配列 (配列番号 1 のヌクレ

オチド1523-2408)の転写を制御するマウス乳癌ウイルスプロモーター(MMTV)(配列番号1のヌクレオチド1-1506)、成長ホルモンターミネーター(GH)(配列番号1のヌクレオチド2409-3654)、SV40複製起点、ネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドpBR322からのプラスミド配列及びアンピシリン耐性遺伝子を含む。ORF6のアミノ酸配列を配列番号2に示す。このプラスミドの様々な機能的フラグメントを他の通常使用される配列で容易に置き換えることができ、これらはプラスミドの設計に対して重要ではない。

本発明のパッケージング細胞株の構築のために有用な他のプラスミドは、pMTE4ORF6である。このプラスミドに含まれるミニ遺伝子のDNA配列は、プロモーターがヒツジメタロチオネインプロモーター(MTプロモーター)[上に引用したM. G. Peterson等]であることを除いて、配列番号1のものと同様である。

本発明のパッケージング細胞株の構築のためのコントロールとして用いるプラスミドは、pLTR.E4(-)である。このプラスミドは、内在性の構成的レトロウイルスMLVLTR並びに内在性E4プロモーター及びE4ORF1の一部を欠いていることを除いてAdE4遺伝子領域の大部分を含む。他のプラスミド配列は、上記のものと同じままである。

本発明の方法の研究のために有用なさらに他のプラスミドは、構成的MLVLTR及び内在性E4プロモーターび完全なE4遺伝子を含むpLTR.E4である。他のプラスミド配列は、上記のものと同じままである。

ORF6発現がrAAV形質導入を増大するために十分であるかどうかを決定するために、誘導性メタロチオネイン(MT)-ORF6ミニ遺伝子をHeLa細胞中に安定にトランスフェクトした。この新しい細胞株、HeLa(MT-ORF6)を以下に記述するようにORF6誘導に反応したLacZ rAAV形質導入に関して評価した。細胞株293(MT-ORF6)は、ベースラインでは比較的不活性であるが二価の陽イオンで誘導することのできるメタロチオネインプロモーターからAd5のE4遺伝子のORF-6を発現する。これらの29

3細胞をベースライン形質導入効率を確立するために含んだ。

B. トランスフェクション及びクローンの選択

リン酸カルシウム沈殿技術により、100mmプレートに接種した、アデノウイルスE1遺伝子の産物を発現するヒト胚腎臓細胞株293 [ATCC CRL 1573] 中またはHeLa細胞中に上記のプラスミドの各々をトランスフェクトした(10 μ gプラスミド/プレート)。トランスフェクション後24時間で細胞を集め、100mmプレートに異なる希釈(1:10-1:100)で約10日間接種した。接種培地は、1mg/mlでG418 (Geneticin、BRL)を含む。以下のアッセイを用いて生じた耐性のコロニーを選択し、そして広げた。クローンの予備的な分析は、以下の実施例に記述するような組み換えアデノ随伴ウイルスAV. CMV LacZの増大された形質導入効率及び

Ad E4タンパク質の免疫蛍光位置測定に基づいた。

実施例2—組み換えAAV及びAV. CMV LacZ形質導入増大アッセイ

E1及びE4遺伝子産物は、組み換えアデノ随伴ウイルス(AAV)機能のために必要とされる。この予備的なアッセイは、96ウェル35mm培養プレート中に実施例1のパッケージング細胞株を接種(2 x 10⁶細胞/ウェル)し、そしてこれらの細胞を精製し熱処理したAV. CMV LacZで1000ウイルス粒子/細胞のMOIで感染させることを含む。

A. 組み換えAV. CMV LacZの調製

この実験の目的のための通常の遺伝子工学技術により、組み換えAAVウイルスを調製した。ヘルパーアデノウイルスの存在下でのプラスミドトランスフェクション [Samulski等、J. Virol.、63:3822-3828 (1989)] により、組み換えAAVを作成した。シスに作用するプラスミドpAV. CMV LacZ [配列番号4] (図10を参照)はp sub 210 [Samulski等、J. Virol.、61:3096-3101 (1987)] に由来し、AAV Rep及びCap遺伝子の位置に大腸菌 β -ガラクトシダーゼミニ遺伝子を含む。組み換えAV. CMV LacZゲノム(4.9kb) [配列番号4]の5'ないし3'の構成は、

(a) pAV2 [C. A. Laughlin等、Gene、23:65-73 (1983)] を鋳型として用いたPCRにより得られた5' AAV ITR (bp1-173) [ヌクレオチド53-219]、

(b) CMV即時型初期エンハンサー／プロモーター [Boshart等、Cell、41:521-530 (1985)] (ヌクレオチド246-839)、

(c) SV40イントロン (ヌクレオチド856-987)、

(d) 大腸菌β-ガラクトシダーゼcDNA (ヌクレオチド1039-4512)、

(e) SV40ポリA付加シグナル (初期及び後期転写単位の両方からの切断／ポリ-Aシグナルを含む237 BamHI-BclI制限フラグメント) (ヌクレオチド4522-4719)、及び、

(f) pAV2からSnaBI-BglIIフラグメントとして得られた3' AAV ITR (ヌクレオチド4759-4925)、
を含む。全ての他のヌクレオチドはプラスミド由来である。

Rep及びCap遺伝子は、トランスに作用するプラスミドpAAV/Ad [上に引用したSamulski等] により供給された。

150mm培養皿で90%融合まで生育した293細胞の単層 (5×10^7 細胞／プレート) を10のMOIでH5. CBALPで感染させた。(H5. 010ALPとも呼ばれる) H5. CBALPは、アデノウイルスE1a及びE1b遺伝子配列 (ジーンバンクのAd5配列 [ジーンバンク登録番号M73260] の地図単位1-9. 2) の位置にアルカリホスファターゼミニ遺伝子を含むrAdである。アルカリホスファターゼcDNAは、このウイルスのCMVで強められるβ-アクチンプロモーターの転写制御下にある。このヘルパーウイルスは、Goldman等、Hum. Gene Ther.、6:839-851 (1995年7月)；Engelhardt等、Hum. Gene Ther.、5:1217-1229 (1994年10月)；に記載されており、そ

して引用することにより本明細書に取り込まれる。

20ml培地/150mmプレートで2%ウシ胎仔血清(FBS)で補足したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)中で感染を行った。感染後2時間で、各プレートに2.5mlのトランスフェクションカクテル中50 μ gのプラスミドDNA(37.5 μ gのトランス作用性及び12.5 μ gのシス作用性)を加え、均一に分配した。

トランスフェクションは、記述されたような[B. Cullen, Meth. Enzymol., 152:684-704(1987)]リン酸カルシウムに基づいたものであった。細胞をこの状態に10-14時間放置し、その後感染/トランスフェクション培地を20mlの新しいDMEM/2%FBSで置き換えた。トランスフェクション後40ないし50時間で細胞を集め、10mM Tris-Cl(pH8.0)バッファーに懸濁し(0.5ml/150mmプレート)、そして超音波処理によりライセートを調製した。このライセートを10mM塩化マンガンにし、その後ウシ脾臓DNase I(20,000ユニット)及びRNase(0.2mg/mlの最終濃度)を加え、反応を37℃で30分間インキュベートした。デオキシコール酸ナトリウムを1%の最終濃度まで加え、37℃でさらに10分間インキュベートした。

処理したライセートを氷上で10分間冷却し、固体CsClを1.3g/mlの最終密度まで加える。このライセートを10mM Tris-Cl(pH8.0)中1.3g/mlのCsCl溶液で60mlの最終容量にし、3つの等しいアリコートに分けた。各20mlサンプルを、密度1.45g/ml及び1.60g/mlの2つの9.0mlの層からなるCsClの段階勾配上に重ねた。

Beckman SW-28ローター中25,000rpmで4℃で24時間遠心を行った。管の底から1mlの画分を集め、LacZ形質導入に関して293または293(E4)で分析した。機能的なAV-CMVLacZウイルスの最大の力価を含んでいる画分を合わせ、連続して3回CsCl中の平衡沈降に供した。ローターの選択は、Beckman NVT-90(80,000rpmで4時間)及びSW-41(35,000rpmで20時間)を含んだ。平衡で

、AV. CMV LacZ は、 $1.40-1.41 \text{ g/ml CsCl}$ で乳白色のバンドとして現れた。屈折率測定から密度を計算した。透析により精製したベクターを 150 mM NaCl を含んでいる 20 mM HEPES バッファー ($\text{pH } 7.8$) (HBS) に交換し、 10% グリセロールの存在下で -80°C に凍結してまたは HBS / 40% グリセロール中 -20°C で液体ストックとして保存した。

混成している H5. CBALP ヘルパーウイルス及び AV. CMV LacZ 力価に関して精製したウイルスを試験した。レポーターアルカリホスファターゼ活性に対する組織化学染色によりヘルパーウイルスを調べた。最終生成物の 1.0% に相当する精製したウイルスのサンプルを 60 mm プレートに接種した 293 細胞の生育している単層に加えた。48 時間後に、細胞を 0.5% グルタルアルデヒド / リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で室温で 10 分間固定し、PBS 中で洗浄 ($3 \times 10 \text{ 分}$)、そして内因性のアルカリホスファターゼ活性を不活性化するために 65°C で 40 分間インキュベートした。この単層を室温に冷却させ、 100 mM Tris-Cl ($\text{pH } 9.5$) / 100 mM NaCl / 5 mM MgCl 中で短時間一回すすぎ、そして 0.33 mg/ml ニトロブ

ルー塩化テトラゾリウム (NBT) 及び 0.165 mg/ml 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸 p-トリイジン塩 (BCIP) を含んでいる同じバッファー中で 37°C で 30 分間インキュベートした。単層を 10 mM Tris-Cl ($\text{pH } 8.0$) / 5 mM EDTA 中で洗浄することにより顕色を停止させた。通常、上記の精製方法は、3 回の浮遊密度超遠心により、全ての検出できる H5. CBALP ヘルパーウイルスを除去した。

ゲノムコピー数 (ウイルス粒子 / ml)、 260 nm での吸収 (A_{260} 粒子 / ml) 及び LacZ 形成単位 (LFU / ml) により AV. CMV LacZ 力価を測定した。ウイルス粒子濃度はサザンブロットィングに基づいた。簡潔に言えば、精製した AV. CMV LacZ のサンプルをキャプシド消化バッファー (50 mM Tris-Cl 、 $\text{pH } 8.0$ / 1.0 mM EDTA 、 $\text{pH } 8.0$ / 0.5% SDS / プロテイナーゼ K 1.0 mg/ml) で 50°C で一時間処理し、

ウイルスDNAを遊離した。反応物を室温に冷却させ、ローディング色素を加え、1.2%アガロースゲルで電気泳動した。基準量のdsAV, CMV LacZ ゲノムもゲル上で分離した。

DNAをナイロン膜上へ電気プロットし、³²Pランダムプライマー標識した制限フラグメントでハイブリダイズし、そして得られたプロットをPhosphorImager 445 SI (Molecular Dynamics) 上で走査した。二重構造型から標準曲線を作成し、サンプル中のウイルスゲノムの数を推定するために用いた。指示細胞をウイルスサンプルの限界希釈で感染させることにより、LFU力価を出した。指示細胞はHeLa及び293及び（以下の実施例10に記述し

た）293（E4）系を含んだ。24時間後に、細胞をグルタルアルデヒド中で固定し、J. M. Wilson等、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 85: 3014-3018 (1988) に記述されたように大腸菌β-ガラクトシダーゼ（LacZ）活性に対して細胞を組織化学的に染色した。1 LFUは、感染後24時間で1個の細胞中に視覚的に検出できるβ-ガラクトシダーゼ発現を生じるのに十分なウイルスの量として記述される。

B. ORF6発現の誘導

10 μMデキサメタゾンまたは150 μM硫酸亜鉛（陰性コントロールに対しては誘導因子を用いない）でのORF6発現の誘導をウイルスの添加の2時間前に開始し、そして実験の期間中続けた。ウイルスの添加後24時間で細胞を集め、超音波処理によりライセートを作成し、そしてβ-ガラクトシダーゼ発現（すなわち、β-ガラクトシダーゼ活性）及びウイルスDNAに関して上記のように分析した。Hirt抽出物を細胞抽出物からの低分子量DNAから調製した。Hirt抽出物の調製及びそれに続くサザンハイブリダイゼーションによる分析を当該技術分野の熟練した者に知られている常法を用いて行った。

誘導因子の非存在下で、パッケージング細胞株は、rAAV感染細胞中でより低いレベルのβ-ガラクトシダーゼを生じる。誘導因子デキサメタゾンでのORF6発現の誘導は、親の293系よりかなり高いレベルまでのAV, CMV Lac

c Z細胞形質導入の付随する増加をもたらす。E 1のみの発現は、アデノウイルスが介在するr A A V形質導入の増大に効果を有するのに不十分であった。

ある陽性クローンの結果を以下の表 I に示す（実施例 4 を参照）。し

かしながら、MMTVプロモーター及びORF 6配列を有する30の細胞株に対して、4つ、すなわち293-27-6、293-27-17、293-27-18及び293-27-28が、デキサメタゾンの存在下でLacZ生産を示す90%以上の青色細胞を示した。

実施例 3 - A d 5 後期タンパク質の免疫蛍光位置測定

実施例 2 のアッセイからの陽性クローンを組み換え E 4 欠失アデノウイルス H 5 d l 1 0 0 4 で感染させ、後期遺伝子発現に対する免疫蛍光アッセイを用いて E 4 相補性に関して選別した。H 5 d l 1 0 0 4 ウイルスをジョンスホプキンス大学の Dr. K e t h n e r から入手し、そしてこれは本明細書の引用文献に含まれる B r i d g e 及び K e t n e r, J. V i r o l.、6 3 2 (2) : 6 3 1 - 6 3 8 (1989年2月) に記述されている。E 4 の O R F 6 は後期 A d 遺伝子発現、特にアデノウイルスのヘキソン及びペントン繊維の形成を補足するので、O R F 6 を含んでいる細胞株はこれらのタンパク質に対する抗体と結合することができる。

実施例 1 の各細胞株を 0. 1 の M O I で E 4 欠失ウイルス H 5 d l 1 0 0 4 ウイルスで感染させる。これらの細胞を、1 : 1 0 希釈のヘキソンまたはペントン繊維のいずれかに対するマウス抗アデノウイルス F I T C 標識モノクローナル抗体 (C h e m i c o n I n t e r n a t i o n a l I n c.、T e m e c u l a、C A) で処理した。抗体との反応により陽性クローンを同定した。

実施例 4 - 相対的ブランク形成効率

実施例 3 において強い相補性能力を示している実施例 1 の細胞株を W 1 6 2 細胞 (E 1 を発現しない E 4 補足 V e r o 細胞株 [W e i n b e

r g 及び K e t n e r, P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A、8 0 (17) : 5 3 8 3 - 5 3 8 6 (1983)] に比較した H 5 d l 1 0 0 4 の相

対的なプラーク形成効率に関して選別した。以下の表IIにおいて、RPE%、すなわち相対的プラーク形成効率は、試験した細胞株におけるH5d11004の力価/W162細胞におけるH5d11004の力価を表す。例えば、293細胞のRPEは0である。

全ての規準により選択した陽性の細胞株を、実施例2、3及び4のアッセイの結果と共に以下の表Iに明らかにする。

表 I

E1/E4二重補足細胞株

細胞株	導入遺伝子	プロモーター	IF/LP	AV, CMVLacZ	RPE%
293-10-3	ORF6	MT	++++	++++	246
293-39-11	ORF6	LTR	++++	+++	52
293-84-31	E4-	LTR	++++	++++	179
293-12-31	全E4	LTR+E4	++++	++++	174
293-27-6	ORF6	MMTV		+++++	327
293-27-17	ORF6	MMTV		++++	313
293-27-18	ORF6	MMTV		+++++	339
293-27-28	ORF6	MMTV		++++	261

実施例5—H5.001CBLacZの構築及び精製

プラスミドpAd.CBLacZを、引用することにより本明細書に取り込まれるK. Kozarsky等、Som. Cell Mol. Genet.、19 (5) : 449-458 (1993) に詳細に記述さ

れたように構築した。このプラスミドは、5' 隣接NheI制限部位、それに続くAd5配列m. u. 0-1、それに続く後ろのバクテリアβ-ガラクトシダーゼの転写を制御するCMVエンハンサー/ニワトリβ-アクチンプロモーター配列[T. A. Kost等、Nucl. Acids Res.、11 (23) : 8287 (1983)] が挿入されるE1欠失、それに続くポリA配列及び3' で隣接するAd m. u. 9-16並びにもう一つのNheI部位を含んでなるミ

ニ遺伝子を含んだ。このプラスミドにおいて、薬剤耐性マーカールを含んでいるプラスミド配列がミニ遺伝子の両側に位置する。

プラスミド pAd. CBLacZ を Nhe I で直鎖状にし、そして Cla I 消化した H5d11004 (実質的に全 E4 遺伝子に相当する地図単位約 92.1 から地図単位 98 までを欠失した Ad5 配列) と共に実施例 1 の新規なパッケージング細胞株にリン酸カルシウム同時トランスフェクション法により同時にトランスフェクトした。

細胞株中で Ad 地図単位 9-16 の間で、相同組み換えがこれらの 2 つのウイルス構築物間で起こり、H5.001CBLacZ [配列番号 3] (図 2) と命名された rAd を生じた。この rAd は、(Ad 地図単位 0-1 (ヌクレオチド 1-330) ; CMV エンハンサー/ニワトリ β -アクチンプロモーター (CB) (ヌクレオチド 370-928) ; 大腸菌 β -ガラクトシダーゼ (ヌクレオチド 945-4429) ; ポリ A (ヌクレオチド 4429-4628) ; 並びに H5d11004 からの Ad5 地図単位 9-92.1 及び 97.3 ないし 100 (ヌクレオチド 4671-35408) を含んでいる) pAd. CBLacZ から

能的に欠失し、そして実質的に構造的に欠失している。

ウイルスブランクを選択し、 β -ガラクトシダーゼアッセイ [上に引用した Wilson (1988)] により選別し、そして 3 回のブランク精製後に H5.001CBLacZ を単離した。精製したウイルスを塩化セシウム密度遠心分離及び大規模生産にも供した。

以下のマウスでの実験のために、ウイルスをカラム精製後に用い、そしてグリセロールを 10% (v/v) の最終濃度まで加えた。ウイルスを使用するまで -70℃ で保存した。

実施例 6-パッケージング細胞株における H5.001CBLacZ の増殖反応速度論

表 I に同定された細胞株を 5 の MOI で組み換え体 H5.001CBLacZ で感染させる。E4 補足細胞株におけるこのウイルスの増殖反応速度論を図 3 に

示す。最大ウイルス収量を以下の表IIにL F U / m l として報告する。

表 II

細胞株	最大ウイルス収量
293-10-3	2.8×10^{10}
293-39-11	9.5×10^8
293-84-31	1.1×10^9
293-12-31	4.5×10^8
293-27-6	2.8×10^{10}
293-27-17	2.5×10^{10}
293-27-18	2.9×10^{10}
293-27-28	1.2×10^{10}

293-27-18細胞（デキサメタゾンにより誘導できるMMTVプロモーターを有するE4 ORF6細胞株）で増殖する場合、このウイルスの最大収量は 2.9×10^{10} L F U / m l である。いくつかの細胞株を5及び20回の間培養し、そしてこれらの培養のウイルス生産は安定なままであった。しかしながら、R P E は細胞の繰り返された培養後減少した。

実施例7—他の組み換えアデノウイルス

p A d C B L a c Z 及び他のヘルパーウイルス間の相同組み換えによりH5. 001 C B L a c Z と同様に他の関連する r A d を調製した。

一つの例として、H5. 000 C B L a c Z は、H5. 001 C B L a c Z と同じミニ遺伝子を含むが、完全なE4遺伝子を有する組み換えE1欠失Ad5である。このr A d を、p A d C B L a c Z 及び野生型Ad5間の相同組み換えにより記述したように調製した。

他の例として、H5. 010 C B L a c Z は、E3遺伝子に小さい欠失を有して(Ad5 sub360バックボーン)、アデノウイルス地図単位0-1、それに続くCMVが強めるニワトリ細胞質β-アクチンプロモーター、大腸菌β-ガラクトシダーゼ遺伝子(l a c Z)、ポリA付加シグナル(p A) 及びアデノウイルス型5地図単位9-100を含む。このr A d を、p A d C B L a c Z べ

クター及びE3遺伝子の14.6 kDタンパク質内に150 bpの欠失を含むAd5ウイルスsub360間の相同組み換えにより調製することができる。例えば、両方とも引用することにより本明細書に取り込まれるJ. F. Engelhardt等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91:6196-6200 (1994年6月)；及びEngelhardt等、

Hum. Gene Ther.、5:1217-1229 (1994年10月)を参照。

これらのrAdをトランスフェクション後に単離し[Graham、Virology、52:456-467 (1974)]、そして2回のプラーク精製に供した。以前に記述された[Engelhardt等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:11192-11196 (1991)]ように塩化セシウム密度遠心分離によりライセートを精製した。リン酸緩衝食塩水を用いてBioRad DG10カラムにウイルスを通すことにより塩化セシウムを除いた。

実施例8—マウスへのLacZ遺伝子の導入

A. マウス筋肉への導入

5ないし6週年齢のオスのC57B/6マウスに麻酔をかけた。前脛骨の筋肉を露出させ、以下のようにrAdH5.000CBLacZ、H5.010CBLacZまたはH5.001CBLacZのいずれかを直接注入した。すなわち、筋肉の筋腹中へ100 μ L Hamilton注射器の33ゲージ針の先を挿入することにより、 5×10^{11} ウイルス粒子/mLのストック濃度で25 μ Lの精製したウイルス懸濁液を注入した。

注入後4、14、28及び60日目に動物を殺した。筋肉を解離させ、液体窒素で冷却したイソペンタン中で凍結した。6 μ M切片をクリオスタットで切断し、固定し、そして β -ガラクトシダーゼ活性に対して37℃で6時間染色した。

4日目及び14日目(最も大量)の染色において各ウイルスに対して青く染色されたrAdが見られたが、28日目までに、H5.001C

B L a c Z は 28 日目により多いウイルスを明らかに示した。60 日目まで、陽性に染色された唯一のウイルスは H5. 001CB L a c Z であった。

B. マウス肺及び血液循環への導入

rAdH5. 000CB L a c Z (コントロール) 及び H5. 001CB L a c Z (1×10^{11} ウイルス粒子) を 6 週年齢の C57B/6 メスマウスに尾の静脈注入及び気管注入により投与した。投与後 4、9、21、28 及び 35 日目にこれらの動物を殺し、肝臓及び肺組織を集めた。導入遺伝子及びウイルス後期遺伝子発現を比較した。

治療的服用量のウイルスで、導入遺伝子と比較して全ての時点で後期ウイルスタンパク質の減少した発現があった。

C. 肝臓における服用量への反応

C57B/6 マウスの肝臓における E4 を欠失した及び E4 が完全な rAd の服用量に対する反応を、 1.5×10^{11} 、 5×10^{10} 、 1.7×10^{10} 、 5.6×10^9 及び 1.9×10^9 ウイルス粒子を尾の静脈に投与し、投与後 4、21、28、35 及び 42 日目に導入遺伝子及びウイルス後期遺伝子発現を比較することにより調べた。

治療的服用量のウイルスで、導入遺伝子と比較して全ての時点で後期ウイルスタンパク質の減少した発現があった。

実施例 9—他の遺伝子導入

A. ヒト OTC 遺伝子の導入

ヒト OTC 遺伝子 [A. L. Horwich 等、Science、224: 1068-174 (1984)] またはヒト CFTR 遺伝子 [Riordan 等、Science、245: 1066-1073 (19

89)] を、上記の L a c Z ベクターの構築に類似した技術を用いて、上記の組み換え E1/E4 欠失アデノウイルス中の導入遺伝子として L a c Z と置き換えるために用いた。

得られたヒト OTC 含有 rAd をヒトの肝細胞に 10 ないし 30 の MOI で投与した。E1/E4 欠失 rAd は、上の実施例に記述したように、E1/E4 欠

失 r A d を筋肉に投与した場合より少ない複製及び少ない後期遺伝子発現を示した。しかしながら、この遺伝子導入の結果は、E 1 遺伝子中の欠失のみまたは E 1 遺伝子中の欠失及び E 2 a 遺伝子中の点突然変異を含んでいる r A d での同様の導入よりよい。

導入遺伝子が C F T R であり、投与方法が肺への気管内投与である場合に同様の結果が示される。

実施例 10-A d 突然変異体で感染された H e L a 細胞における r A A V L a c Z (A V. C M V L a c Z) の形質導入効率

A. ウイルス

以下のウイルス、

- (1) 293細胞中で増殖した野生型 A d 5、
- (2) 293細胞中で増殖した A d d 1110 (55kb E 1 B 遺伝子を欠失した A d) [B a b i s s 等、J. V i r o l.、52 (2) : 389-395 (1984) 並びに B a b i s s 及び G i n s b e r g、J. V i r o l.、50 (1) : 202-212 (1984)]、
- (3) 293細胞中で増殖した H 5. C B A L P (上記のように、E 1 A 及び E 1 B 遺伝子を欠失し、C M V が強める β -アクトチンプロモーターからアルカリホスファターゼを発現するミニ遺伝子を含んでいる A d)、
- (4) 293細胞中で増殖した A d t s 125 (DNA結合タンパク質をコードする E 2 A 遺伝子中に温度感受性突然変異を有する A d) [E n s i n g e r 及び G i n s b e r g、J. V i r o l.、10 (3) : 328-339 (1972)]、
- (5) R i c e 及び K l e s s i g、J. V i r o l.、56 (3) : 767-778 (1985) に記述されたような E 2 A-補足 g m D B P 細胞中で増殖した A d d 1802 (E 2 a 遺伝子を欠失した A d)、
- (6) E 4-補足 V e r o W 162 細胞 [W e i n b e r g 及び K e t n e r、P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A、80 (17) : 5383-5386 (1983)] 中で増殖した A d d 11004 (E 4 遺伝子を欠失

したAd)、及び、

(7) E4-補足Vero W162細胞[上に引用したWeinberg及びKetner]中で増殖したAd d11010 (E4遺伝子のORF6を欠失したAd)、
をこの実験に用いた。

全てのウイルスを2回の連続したCsCl中の浮遊密度超遠心により精製した。

B. 実験方法

6ウェルの36mm培養プレートに接種したHeLa細胞(2×10^6 細胞/ウェル)を、10pfu/ウェルのMOIで野生型Ad5または部分Aに記述したようなアデノウイルス初期遺伝子突然変異体で感染させた。感染を1.0ml DMEM/2% FBS中で行った。感染後6時間で単層を洗浄し、そして 4×10^9 ウイルス粒子/mlでAV. CMV LacZを含んでいる1.0mlの新しいDMEM/2% FBS

培地を加えた。これらの実験に用いたAV. CMV LacZウイルスロットは、組織化学染色によりH5. CBALPヘルパーウイルスを含まないことが示されたけれども、混成するアデノウイルスがないことを確かにするために使用前にウイルスサンプルを熱処理(20分間60℃)に供した。2時間後に1.0mlのDMEM/11.5% FBSを各ウェルに加えた。

AV. CMV LacZの添加後24時間で細胞を集めた。ウイルス形質導入を3種のデータ、すなわち、 β -ガラクトシダーゼ活性に対する組織化学染色(以下)、細胞内 β -ガラクトシダーゼの比活性(実施例11)及びウイルスDNAの分子形態(実施例12)に関して評価するために各試験条件を三重に行った。

HeLa細胞を、J. M. Wilson等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 3014-3018 (1988)に記述されたように大腸菌 β -ガラクトシダーゼ(LacZ)活性に関して組織化学的に染色した。試験する異なる組み合わせは、AAVベクターのみ(AV. CMV LacZ)、ベクター及び野生型Ad5(+Ad5)、ベクター及びd1110(+d1110

）、ベクター及びA d突然変異体H 5. C B A L P（+H 5. C B A L P）、ベクター及びA d突然変異体t s 1 2 5（+t s 1 2 5）、ベクター及びA d突然変異体d 1 8 0 2（+d 1 8 0 2）、ベクター及びA d突然変異体d 1 1 0 0 4（+d 1 1 0 0 4）並びにベクター及びA d突然変異体d 1 1 0 1 0（+d 1 1 0 1 0）でトランスフェクトした細胞を含んだ。

組み換え β -ガラクトシダーゼ活性に対する組織化学染色の倍率10xでの顕微鏡写真（示さない）において結果を観察した。これらの結果

は、野生型A d 5並びにE 2 a突然変異体t s 1 2 5及びd 1 8 0 2が、陽性の青色細胞の数及び染色強度の度合いにより測定されるようにL a c Z r A A V形質導入の顕著な減少を引き起こすことを示した。d 1 1 1 0（E 1 B-55 kDa）及びd 1 1 0 1 0（O R F 6）の両方は、陽性の青色細胞の数に関してA d 5、t s 1 2 5及びd 1 8 0 2のものに匹敵するレベルまで形質導入を高めた。

E 1欠失組み換え体H 5. C B A L Pは、A V. C M V L a c Z形質導入のいかなる顕著な増加も与えなかった。E 4欠失突然変異体d 1 1 0 0 4で感染させたH e L a細胞で得られた形質導入の顕著な増加の欠如により明らかなように、E 1のみの発現は、アデノウイルスが介在するr A A V形質導入の増大において効果を有するのには不十分であった。形質導入の著しい減少が、同時感染するアデノウイルスのE 4領域からのO R F 6の除去の結果起こった（図5 A）。

これらの結果は、アデノウイルス遺伝子産物E 4及びE 1が、転写的に活性のあるd s DNA中間体の形成を間接的に促進することを示すと考えられる。

実施例 11-増大したベクター形質導入の定量

（A）実施例 10 Bに記述したH e L a細胞の二重の組をこの実験に用いた。A V. C M V L a c Z組み換え体の添加後24時間で、細胞内 β -ガラクトシダーゼアッセイのために細胞ペレットを0.5 mlのP B Sに懸濁し、超音波処理した。細胞残渣を遠心分離（15,000 X g、10分間）により除き、澄んだ抽出物を全タンパク質[M. B r a d f o r d、A n a l. B i o c h e m.、72（1-2）：248-254（1976）及びM. B r a d f o r d等、F

ed. Proc.、

3.5 (3) : 274 (1976)] 及び α -ニトロフェニル β -D-ガラクトピラノシド (ONPG) を基質として用いた β -ガラクトシダーゼ活性 [上に引用した Sambrook 等] に関してアッセイした。

図5Aは、感染した HeLa 細胞からのライセート中の β -ガラクトシダーゼ酵素活性を測定することにより定量し、そして全タンパク質に関してもアッセイした形質導入効率を示す。図5Aにおいて、試験条件を水平軸に沿って示し、そして ONPG を基質として用いた細胞内 β -ガラクトシダーゼ比活性 (ミリユニット/mg タンパク質) を垂直軸上に表した。各棒の下に、AV. CMV Lac Z ベクターのみを与えられた細胞に対する比活性の誘導倍率を示す。

図5Aの結果は、精製した rAAV のみで得られたものに比較して、E2a 突然変異体 ts125 及び d1802 が、それぞれ、 β -ガラクトシダーゼ活性の 134 倍及び 225 倍の増加を生じたことを示す。それに比較して、wtAd5 で感染させた細胞は、 β -ガラクトシダーゼ活性の 107 倍の増加を生じた。

(B) 他の実験において、HeLa 細胞 (2×10^6) を野生型 Ad5 または E2 突然変異体 d1802 の増加する多重度で感染させた。感染後 6 時間で単層を洗浄し、そして 1000 ウイルス粒子/細胞で AV. CMV Lac Z で感染させた。AV. CMV Lac Z の添加後 24 時間で細胞を集め、全タンパク質及び β -ガラクトシダーゼ活性に関してアッセイした。

結果を図5Bの棒グラフに示し、この中で、アデノウイルスの MOI を水平軸に沿って、そして細胞内 β -ガラクトシダーゼ比活性を垂直軸に沿って示す。rAAV 形質導入の増大は、野生型 Ad5 及び d180

2 の両方に対して 1 から 50 まで MOI で投入したヘルパーアデノウイルスに比例した。ウイルスのより多い投入量は細胞変性であり、 β -ガラクトシダーゼ発現の減少をもたらした。rAAV 感染の前または感染時に細胞を感染させた場合に増大した形質導入が得られた。E1 欠失組み換え H5. CBALP 及び E4 欠失突然変異体 d11004 は、AVCMV Lac Z 形質導入のいかなる顕著な増

幅も与えなかった。d1110 (E1B-55kDa) 及びd11010 (ORF6) で感染された両方の細胞が、Ad5、ts125またはd1802で感染されたものよりかなり低い全 β -ガラクトシダーゼ活性を示した。

実施例12-AV. CMV L_{ac}Z形質導入細胞における低分子量DNAの分析

これらのアデノウイルスの初期遺伝子突然変異体を用いた研究は、ウイルス粒子自体よりむしろアデノウイルス遺伝子の発現がrAAV形質導入の増大を招くことを示唆した。これらの機構をさらに調べ、そしてssのdsゲノムへの転化がrAAVの形質導入効率を制限するかどうかを決定するために、rAAVゲノムの分子状態を感染した細胞におい特徴づけた。RFm形成及びl_{ac}Z rAAV形質導入の間の関係を同時染するウイルスの投入量を変える(MOI=1、5または10) 実験において調べた。

(A) 実施例10に記述したようなHeLa単層の二重の組を、組み換え体AV. CMV L_{ac}Zで形質導入し、そしてヘルパーアデノウイルスを含んでまたはこれを含まずに培養した後24時間で集めた。

B. Hirt, J. Mol. Biol., 26: 365-369 (1967) により最初に記述された方法の修正を用いて、エピゾームDN

Aを細胞ペレットから抽出した。簡潔に言えば、細胞を320ml Tris-CI (pH8.0) / 10mM EDTAに懸濁し、そしてSDSを1%の最終濃度まで加えた。この混合物を37℃で30分間インキュベートした。プロナーゼ及びプロテイナーゼKをそれぞれ500 μ g/ml及び20 μ g/mlの最終濃度まで加え、反応を37℃で2時間インキュベートした。塩化ナトリウムを1.1Mの最終濃度まで加え、4℃で一晩インキュベートした。4℃のインキュベーション中に生じた沈殿物を30分間20,000xgでペレットとし、そして澄んだ上清を注意深く取り除いた。この上清をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(25:24:1)で一回、続いてクロロホルム：イソアミルアルコール(24:1)で抽出した。核酸をエタノールで沈殿させた。最終ペレットを50 μ l Tris-CI (pH8.0) / 1.0mM EDTAに懸濁

した。

これらのHirt抽出物をサザンブロットハイブリダイゼーションにより分析した。各Hirt抽出物のサンプル(5 μ l)を1.2%アガロースゲルで分離し、ナイロン膜上に電気ブロットし、そしてAV. CMV LacZに用いたSV40ポリAシグナルの³²Pランダムプライマー標識したcDNAでハイブリダイズした。

実施例12の実験のオートラジオグラム(示さない)は、ss AV. CMV LacZゲノム(SS)、モノマー複製分子型(RFm)及びコンカテマー複製分子型(RFd)に対応するバンドを同定し、標識する。ss AV. CMV LacZ (SS)、モノマー複製分子型(RFm)及びコンカテマー複製分子型(RFd)に対応するバンドを同定し、標識した。RFmバンドの基準とするために、AV. CMV LacZを保

有しているプラスミドを全ゲノムを遊離するように消化した。オートラジオグラムの露出時間は14時間及び69時間であった。

このオートラジオグラムにおいて、溶解感染の間に存在する分子種の完全な範囲が、LacZ rAAV及び野生型アデノウイルスの両方で感染された細胞において示された。投入したssゲノム(SS)並びにds複製分子中間体のモノマー及びダイマー型(RFm及びRFd)の両方が存在する。これは、ssゲノムが検出される唯一の分子型である、精製したrAAVのみで感染させた細胞と対照的である。アデノウイルス初期遺伝子突然変異体で同時感染させた細胞の分析は、rAAVゲノムのds型の形成及びLacZ形質導入の増大の間の直接の相関関係を示した。rAAV形質導入を増大することに効果のない突然変異体アデノウイルス(すなわち、E1欠失突然変異体H5. CBALP及びE4欠失突然変異体d11004)は、AAVのds型の形成を促進することができなかった。

E2a(d1802)を欠失したまたはE1(d1110)もしくはE4(d11010)を部分的に欠失したアデノウイルスで感染された細胞は、大きさがLacZ rAAVゲノムのds複製分子モノマー(RFm)に同一であり、そ

して存在量が β -ガラクトシダーゼ活性の発現に直接相関関係があるバンドをさらに示した（これらの記述した結果を実施例14の結果と比較せよ）。よりゆっくり移動する二重構造 r A A V のダイマーのようなコンカテマーもまた、上記のオートラジオグラムにおいて検出した。

E 1 及び E 4 発現の存在下で、r A d 形質導入は d s R F モノマー及びダイマーの出現を常に伴った。

サンプルレーン+H 5. C B A L P の高分子量のバンドは、ヘルパーウイルス DNA である。C B A L P ミニ遺伝子も S V 4 0 ポリ A シグナルを用いるので、ヘルパーウイルス DNA が S V 4 0 プローブにより認識される。

(B) 別の実験において、実施例10Bに記述したように H e L a 細胞を w t A d 5 または E 2 欠失突然変異体 d 1 8 0 2 で感染させた。単層を 2 4 時間後に集め、 β -ガラクトシダーゼ活性及び R F m 合成に関して分析した。上記のオートラジオグラムに示されたものと同様のモノマーバンドを P h o s p h o r I m a g e r 4 4 5 S I で定量し、値 (C P M) を特定した。

結果を図 8 A 及び 8 B のグラフに示し、この中で、 β -ガラクトシダーゼ比活性及び C P M を各図の垂直軸に沿って表す。アデノウイルス M 0 1 を各図の水平軸に沿って示す。低い M O I 感染 (1、5 及び 1 0) から得られたデータを示す。重要なことには、E 1 / E 4 発現アデノウイルスで感染させた細胞において、r A A V ベクター形質導入及び二重構造型の蓄積の間の密接な相関関係を得ることができた。 β -ガラクトシダーゼのレベル及び R F m 型の存在量は、感染する野生型 A d (図 6 A) 及び d 1 8 0 2 (図 6 B) の量に比例して増加した。これらのデータは、エピゾーム二重構造中間体の合成が形質導入における絶対的な事象であることを示唆する。

実施例 1 3 - 二重構造末端の分析

以下は、R e p の存在下 (+ R e p) または R e p の非存在下 (- R e p) での相補的 A A V 鎖のリーディング鎖合成のモデルの説明である。図 7 A - 7 F を参照。R e p は、閉じた末端を有する二重構造を開いた

末端の二重構造に転化できる末端分解活性を発現する。Repの非存在下では、共有結合的に閉じたヘアピン構造をそのまま残して、末端分解が損なわれる。レスキューされたdsAAVゲノムの両方の鎖がウイルス粒子内にパッケージされるので、これらの条件下で、ヘアピンは左側及び右側に見いだされると予想される。図7B-7Fは、アデノウイルス遺伝子発現に反応してssAV. CMV LacZ から合成される二重構造RFmの末端構造を同定するための方法を示すフローチャートである。

図7Cは、rAV. CMV LacZ の閉じた末端及び開いた末端のフラグメントを示す。図7D、7E及び7Fは、末端分解なしに位置4509でのNotI消化により生じた開いた末端の及び共有結合的に閉じた二重構造フラグメントの混合物を示す。NotI 4509消化は、ハイブリダイゼーションの標的（すなわち、SV40 pA）に関連して右のITRを含む361bpフラグメントを遊離する簡便な方法を提供する。末端分解があると、開いた末端の361bpフラグメントのみがそのような消化により生じる（図7D）と予想される。

得られた電気泳動ゲル（示さない）は、レーン（1）に、AV. CMV LacZ cDNAを保有しているプラスミドのrAAVベクターを遊離する消化及びそれに続く右末端の361bpフラグメントを遊離するNotIでの消化の結果を示した。レーン（2）において、野生型Ad5で感染させ、そしてAV. CMV LacZ で形質導入したHeLa細胞から抽出したNotI消化したHirt DNAのサンプルが、2つのフラグメント、標識された型I及び型IIの遊離を生じた（図8A及び8Bも参照）。ssAV. CMV LacZ (SS) 及びRFmの移動も見られた。

動も見られた。

アデノウイルスで感染させた細胞中に蓄積したdsAV. CMV LacZ 中間体は、ベクターITRの二重構造領域から開始するリーディング鎖DNA合成の結果であると思われる。Repの非存在下で、この転化事象は、一方の末端が開き、そしてもう一方が共有結合的に閉じた分子を生じると予想される（図7A）。このds中間体の構造をさらに特徴づけるために、rAV. CMV LacZ

及びA d 5で同時感染させた細胞からのH i r t抽出物をN o t Iで消化し、開いたままの場合約361bpの長さであるd s中間体の末端を遊離させた。得られたフィルターを右側のI T Rのすぐ上流に位置するS V 40ポリA付加シグナルに特異的なプローブでハイブリダイズした。少なくとも2つの型、開いた末端の構造(型II)を予示するゲルの位置に移動するもの及びもう一つのよりゆっくりと移動する種(型I)が二重構造ゲノムの右末端から遊離された。この結果はモデル(図7A-7F)と一致したけれども、型Iの構造を確かに予示することは困難であった。しかしながら、その遅れた移動性は、開いた末端の型IIと異なる構造を示唆する。

実施例14-誘導性のE4 ORF6 cDNAで安定にトランスフェクトした293細胞におけるAV. CMV LacZ形質導入効率の分析

このアッセイに用いた細胞株を実施例1に記述したように調製した。6ウェル35mm培養プレートに293(MT-ORF6)細胞及びHeLa(MT-ORF6)細胞を接種し(2×10^6 細胞/ウェル)、そして1000ウイルス粒子/細胞のMOIで精製し熱処理したAV. CMV LacZで感染させた。0から増加する濃度までの硫酸亜鉛でのORF6発現の誘導をウイルスの添加前2時間に開始し、そして実験の

期間中続けた。

ウイルスの添加後24時間で細胞を集め、超音波処理によりライセートを作成し、そして先行する実施例に記述したように β -ガラクトシダーゼ発現(すなわち、 β -ガラクトシダーゼ活性)及びウイルスDNAに関して分析した。細胞抽出物からの低分子量DNAからH i r t抽出物を調製した。H i r t抽出物の調製及びそれに続くサザンハイブリダイゼーションによる分析を上の実施例に記述したものと同様に行った。

この実験の結果は、以下のとおりであった。

(1) 比活性

結果を図8Aの棒グラフに示す。比活性(ミリユニット β -ガラクトシダーゼ/mgタンパク質)を垂直軸に沿って表す。各棒の下に、誘導のために用いた亜

鉛の濃度、293細胞に対する誘導倍率及び亜鉛の非存在下で維持された293 (ORF6)細胞に対する誘導倍率を示す。図8Aに示すように、 Zn^{+2} の非存在下で、293 (MT-ORF6)細胞株は、rAAVに感染した293細胞において39倍高いレベルの β -ガラクトシダーゼを生じた。増加する量の Zn^{+2} でのORF6発現の誘導は、親の293系より445倍高いレベルまでのAV. CMV LacZ細胞形質導入の付随する増加をもたらした。E1のみの発現は、アデノウイルスが介在するrAAV形質導入の増大における効果を有するのに不十分であった。

β -ガラクトシダーゼの比活性は、E1遺伝子のみを発現した293細胞における1.0 mUnits/mgに比較して、E1/E4を発現する293細胞において196.2 mUnits/mgであった。これらの実験は、E1及びE4の両方のアデノウイルス遺伝子の合わせた発

現に依存するrAAV形質導入を高めるための機構を支持する。

(2) AV. CMV LacZ ゲノムの分子の分析

二重構造モノマー複製分子型 (RFm) を定量し、その値 (CPM) を図8Bの棒グラフの垂直軸に表した。誘導のために用いた亜鉛の濃度及び0 mM亜鉛中で維持した293 (ORF6)細胞に対する誘導倍率を各棒の下に示す。

オートラジオグラム (示さない) は、上記のAV. CMV LacZ 形質導入細胞からのHirt抽出物を分離したアガロースゲルを示す。全配列を遊離するためにAV. CMV LacZ cDNAを保有しているプラスミドを消化し、そしてオートラジオグラムのレーンに添加した。従って、このレーンに現れたバンドは、モノマー二重構造複製分子型 (RFm) の移動を示した。ssAV. CMV LacZ ゲノム (SS)、RFm及び二重構造複製分子型のダイマー (RFd) の移動も示した。(0)、(50)、(100)、(150)、(200)及び(250)と標識したオートラジオグラムのレーンは、示した濃度の亜鉛で誘導した293 (MT-ORF6)細胞からのサンプルを含んだ。AV. CMV LacZ で形質導入した293細胞からのHirt抽出物 (293と標識したレーン) も示した。

Hirt 抽出物の分析は、rAAVで感染させた293 (MT-ORF6) 細胞において、同様に感染させた293細胞に存在しないRFmの存在を示した。AV. CMV LacZ 形質導入効率を説明する誘導特性 (図8A及び8B) を比較した場合、それらの結果を図Cに表した。図8Aからの比活性 (ミリユニット β -ガラクトシダーゼ/mgタンパク質) データ及び図8BからのAV. CMV LacZ の1分当たりのカ

ウント (CPM) のデータを垂直軸に沿って表し、そして実験の間に用いた硫酸亜鉛の濃度を水平軸に沿って示す。

2つの特性は、ほとんど鏡像である。重要なことには、ORF-6発現を Zn^{+2} で誘導した時に生じる LacZ 形質導入活性の増加に比例して、RFmが増加した (図8C)。同様の結果が、グルココルチコイド反応性MMTVプロモーターからORF6を発現する293由来の細胞株で得られた。

実施例15-誘導性ORF6ミニ遺伝子を保有するHeLa細胞における高められたAV. CMV LacZ 形質導入

形質導入中培地に硫酸亜鉛誘導因子の非存在下で、または50、100、150、200もしくは250 μ M硫酸亜鉛誘導因子の存在下で、HeLa (MT-ORF6) 細胞 (2×10^6) を1,000 AV. CMV LacZ 組み換え粒子/細胞のMOIで形質導入した。24時間後に細胞を集め、超音波処理により細胞抽出物を調製し、そして導入遺伝子発現 (すなわち、 β -ガラクトシダーゼ活性) に関して分析した。細胞単層を β -ガラクトシダーゼ活性に関して組織化学的に染色した。

得られた顕微鏡写真 (示さない) は、組織化学染色が培地中の Zn^{+2} の濃度を0から200mMまで上げるにつれて LacZ 陽性と記録される細胞の数が増加することを表すことを示した。250mMの濃度の亜鉛は、細胞に対して有毒であることが見いだされた。

比活性 (ミリユニット β -ガラクトシダーゼ/mgタンパク質) を図9に垂直軸に沿って表す。各棒の下に、誘導のために用いた亜鉛の濃度、HeLa細胞に対する誘導倍率及び亜鉛の非存在下で維持したHeLa (MT-ORF6) 細胞

に対する誘導倍率を示す。組織化学染色は、培

地中の Zn^{+2} の濃度を0から200mMまで上げるにつれてライセート中の β -ガラクトシダーゼの量が増加することを示した。

実施例16-E4ORF6の誘導後のAV. CMVLacZで形質導入したHeLa (MT-ORF6)細胞からの低分子量DNAのサザンブロット分析

二重構造中間体の合成がAV. CMVLacZ形質導入の増大に寄与するかどうかを決定するために、増加する濃度の Zn^{+2} の存在下で実施例15に記述したようにAV. CMVLacZで形質導入したHeLa (MT-ORF6)細胞からHirt抽出物を調製した。

硫酸亜鉛の濃度(0、50、100、150、200及び250)で誘導したHeLa (MT-ORF6)細胞のサンプルを1.2%アガロースサザンゲル(示さない)で分離し、ナイロン膜へ移し、そしてLacZ特異的プローブでハイブリダイズした。一つのレーンは、全ゲノムを遊離するように消化したAV. CMVLacZをコードしているプラスミドを含んだ。ss AV. CMVLacZ (SS)、二重構造モノマー(RFm)及び二重構造ダイマー(RFd)に対応するバンドをゲル上に示した。

サザン分析は、HeLa及び非誘導HeLa (MT-ORF6)細胞がssゲノムと一緒に移動する単一のバンドをサザンブロット上で表すことを示した。ORF6の誘導は、検出できるレベルのdsモノマーの出現をもたらしたが、より高い濃度の Zn^{+2} でだけであった。RFdと一緒に移動するバンドが全ての細胞調製物に存在し、モノマーがおそらくダイマーの前駆物質であるので、この関連性ははっきりしない。

実施例17-ネズミ肝臓へのインビボAV. CMVLacZ標的効率に

対するアデノウイルス感染の効果

ネズミ肝臓におけるrAAV形質導入に対するアデノウイルス遺伝子発現の影響を、肝門静脈中へアデノウイルスの初期遺伝子突然変異体続いてrAAVを連続して注入することにより調べた。

ケタミン (70 mg/kg) 及びキシラジン (10 mg/kg) の腹腔内注射により4ないし6週年齢のBalb/cマウス [Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine] に麻酔をかけた。肝臓を調べるために、1 cmの左側腹切開を行い、脾臓を露出した。

50 μ l HBS中の精製し、熱処理したAV. CMV LacZのサンプル (1×10^{11} ウイルス粒子) を単独でまたは50 μ lの最終容量に 2×10^{10} A26。粒子の精製したd11004、H5. CBALPまたはts125を含んでいヘルパーウイルスを加えて用いた。アデノウイルスの投与量は、>25%の肝細胞に形質導入するのに十分であった。ウイルス混合物を脾臓被膜のちょうど下に注入し、そして3-0 vicrylで腹を閉じた。

感染後3日目に解剖を行い、組織をO. C. T. 包埋化合物中で凍結した。凍結切片 (6 μ m) (LacZ + ALP) を調製し、そして β -ガラクトシダーゼ酵素及びアルカリホスファターゼ活性に対して組織化学的に染色した。切片をニュートラルレッドで対比染色し、スライドに載せた。

倍率20xでAV. CMV LacZで標的とされた β -ガラクトシダーゼ陽性肝細胞を得た。遺伝子導入後3日目に集めた肝臓組織の組織化学分析は、 10^{11} 粒子の精製したrAV. CMV LacZのみの肝門静

脈への投与が、感知できる遺伝子導入と結びつかない (細胞の<0.01%) ことを示し、これは、rAAV系の本来備わっている非効率性を確かめた。

E4欠失ウイルスの前もった注入は、マウス肝臓におけるrAAV形質導入に対して何の影響も有さず、一方、E1欠失ウイルスは、LacZ陽性肝細胞の約0.1%までのわずかな増加を示した。rAAV形質導入の最も顕著な増加は、10-25%の肝細胞において検出されるLacZ発現を有するE2aアデノウイルス突然変異体ts125の注入の結果生じた。アデノウイルス遺伝子発現及びrAAV形質導入の間の直接の関係は、LacZ rAAV及びALPを発現するE1欠失ウイルスの両方を注入した動物において示された。同時感染の偶然の発生を最小限にするために、アデノウイルスの投与量を10倍減少した。組織化学研究は、 β -ガラクトシダーゼを発現する肝細胞の大部分においてALP及

び β -ガラクトシダーゼの同時局在化を示した。

実施例18-ネズミ肺へのインビボAV. CMV L a c Z 標的効率に対するアデノウイルス感染の効果

マウス肺へのrAAVが介在する遺伝子導入の研究のために、マウス肝臓に対して実施例17に記述した実験を適応した。肺実験のために、DeMatteo等、Transplantation (Baltimore)、59(5):787-789(1995)に記述されたように麻酔をかけたBalb/c動物に挿管した。簡潔に言えば、気管を露出するために首に正中線2cm皮膚切開を行った。2インチ18ゲージの血管カテーテルを口を通して通し、気管の真ん中部分に位置させ、そして齧歯類の人口呼吸装置(#55-3438Harvard)に連結

した。ポリエチレン(PE#10、Intramedic)を側開口部(side port)からカテーテルを通して与え、気管の分岐点を越えて進めた。Hamilton注射器を用いて、ウイルスサンプル(30 μ L)をポリエチレン管を通して肺へゆっくりと注入した。サンプルは、肝臓注入に対して記述したような、ヘルパーアデノウイルスを含んだ、またはこれを含まない精製し熱処理したAV. CMV L a c Zの同じ調整物を含んだ。

感染後72時間で組織を集めた。凍結切片を β -ガラクトシダーゼ活性に対して組織化学的に染色し、ニュートラルレッドで対比染色した。

肺からの凍結切片(AV. CMV L a c Z)は、AV. CMV L a c Zで標的とされた β -ガラクトシダーゼ陽性の気道上皮細胞を示した。同様の研究を肺への遺伝子導入のネズミモデルにおいて行った。アデノウイルスをrAAVの注入前に気管へ注入した。3日後の肺組織の分析は、rAAVのみを注入した動物において非常にまばらな β -ガラクトシダーゼ陽性細胞を示した。E1またはE4のいずれかを欠失したアデノウイルスを前もって注入した動物において、rAAV形質導入の検出できる増大は認められなかった。形質導入の実質的な増大は、E2a突然変異体アデノウイルスを投与した動物の伝達気道及び肺細胞において得られた。

肝臓及び肺への遺伝子治療のネズミモデルにおけるこれらの実験は、rAAV形質導入の効率が、投入したssゲノムの転写的に活性のあるds中間体への限られた転化のために低いこと、及びこの転化がアデノウイルスE1及びE4遺伝子産物の発現により促進されることを確かめた。

実施例19—形質導入を増大することのできる制御されたミニ遺伝子を含む第二世代rAAV

先行する実施例に記述した実験は、以下の原則、すなわち、(1) 精製したrAAVはインビトロ及びインビボにおける比較的効率の悪い遺伝子導入媒体であり、そして、2) 形質導入の律速段階は、ウイルスの侵入ではなくむしろウイルス粒子のssDNAゲノムの転写的に活性のあるdsDNAゲノムへの転化である、を示した。アデノウイルスは、その遺伝子のサブセットの発現を通して実質的に形質導入を増大することができる。アデノウイルスは、ウイルス粒子ゲノムのそのds型への転化を促進することによりこれを行う。これを達成するための一つの方法は、形質導入を増大するために必要な最小のアデノウイルス遺伝子、すなわち、E4のORF6領域を発現するミニ遺伝子を組み換えAAVゲノム中に含むことである。この改変rAAVを設計することにおいて2つの方法が考えられた。第一の方法は、連続した2つの転写単位、治療的遺伝子が発現するもの及び構成的プロモーターからE4 ORF6を発現するものを有するrAAVゲノムに基づく。これは実際多くの状況において有用であることができるけれども、ORF6の構成的発現は、細胞に対して有害な可能性があり、そしておそらく破壊的な免疫反応を引き起こす可能性がある。

このrAAVの第二の型は、この場合誘導性のプロモーターから発現されるORF6転写単位に加えて治療的ミニ遺伝子を含む。この第二の遺伝子rAAVが細胞（エクスピボ法）または患者（インビボ法）に投与される場合、誘導因子は遺伝子導入時にまたはそのすぐ後に投与される。dsゲノム型またはその組み込まれた誘導体が安定であるなら、O

RF6の誘導は受容体細胞への遺伝子導入時に必要であるだけである。この後、

その誘導因子を取り去り、そしてORF6遺伝子を止める。

この誘導性ORF6の概念を示すrAAVを構築し、インビトロで試験した。ベクターpAV. CMVALP. GRE-ORF6の概要図を図11に示し、その配列を配列番号5に示す。この第二世代構築物は、隣接する5'及び3' AAV ITR配列を含む。ヒト胎盤アルカリホスファターゼcDNA (ALP) をミニ遺伝子中に含み、その中でサイトメガロウイルスの即時型初期遺伝子からのプロモーターが転写を誘導する。第二の転写単位をITRの間にアルカリホスファターゼミニ遺伝子と連続して同方向にクローン化した。第二の転写単位は、SV40ポリA付加シグナルを有してグルココルチコイド依存性プロモーター (GRE) からAd5-E4-ORF6を発現する。これを第二世代rAAV構築物と呼ぶ。

より詳細には、pAV. CMVALP. GRE-ORF6 [配列番号5] は、LacZ導入遺伝子及びrAAVのssからdsへの転化を促進するAd E4 ORF6を含んでいる新規なrAAVを生じる。このプラスミドは、隣接するAAV5' ITR配列 (ヌクレオチド53-219)、CMVエンハンサー/プロモーター (ヌクレオチド255-848)、ヒト胎盤アルカリホスファターゼcDNA (ALP) (ヌクレオチド914-2892)、SV40ポリA (ヌクレオチド2893-3090)、GREプロモーター (ヌクレオチド3114-3393)、Ad5 E4-ORF6 cDNA (ヌクレオチド3402-4286)、SV40ポリA (ヌクレオチド4315-4512) 及び3' AAVITR (ヌクレオチド4547-4713) を含む。全ての他のヌクレ

オチドはプラスミド由来である。

第二世代rAAV構築物をrAAVウイルス粒子を生産し、そして精製するために用い、これを未処理のままの、またはデキサメタゾンと共にインキュベートしたHeLa細胞にさらした。デキサメタゾンの非存在下 (ORF6がほとんど発現されないはずの条件) で、アルカリホスファターゼ遺伝子の発現により測定されるように形質導入がほとんど見られなかった。デキサメタゾン中でインキュベートした細胞は、ORF6遺伝子を発現し、そして形質導入効率は少なくとも

5倍高められた。このことは、rAAVから発現された遺伝子産物が導入遺伝子の発現を増大するためにシスに働くことができることを支持する証拠を提供する。

実施例20—骨髓への遺伝子治療への応用

骨髓への遺伝子治療は、標的細胞が造血幹細胞であるエクスピボ遺伝子治療の実例を表す。基本的な方法は、治療的ミニ遺伝子を造血幹細胞の染色体DNA中に含み（すなわち、組み込み）、これを骨髓を除去した受容体患者中へ移植することであり、遺伝的に修正された幹細胞の子孫でリンパ造血系の再集団を可能にする。

この方法の問題は、幹細胞中へ効率よくトランスフェクトする遺伝子であった。骨髓への遺伝子治療の大部分の研究は、あまり効率のよくない組み換えレトロウイルスを利用してきた。一つの問題は、レトロウイルスがそれらのプロウイルスを標的細胞が分裂している時にだけ組み込むことである。残念ながら、インビトロで大部分の幹細胞は不活発で分裂していない。rAAVは非分裂幹細胞へより効率よくプロウイルスを組み込む見込みを有する。しかしながら、精製したrAAVは、単独で用いた場合組み込みに関してあまり効率がよくない。培養した細胞にお

いて、組み込みは1%未満の細胞において見られる。ssからdsゲノムへの転化を活性化する同じ条件が、染色体DNAへのds中間体の組み込みも増大する。

従って、本発明の方法及び組成物の望ましい応用は骨髓への遺伝子治療においてである。本発明により、幹細胞を上記の構築物及び方法（例えば、実施例19を参照）を用いてエクスピボでrAAV及び誘導因子で遺伝的に修正する。遺伝的に修正された幹細胞を続いて通常の技術により移植する。

本発明の多数の修正及び変形が、上に同定した明細書に含まれ、そして当該技術分野の熟練した者にとって明らかであると予想される。パッケージング細胞株及びrAdの構築のための異なる導入遺伝子及びプラスミドの選択またはウイルスもしくは免疫調節剤の選択もしくは投与量のような本発明の組成物及び方法の

そのような修正及び改変は、本明細書に付加した請求の範囲に含まれると考えられる。

配列表

(1) 一般的な情報

(i) 出願者：ペンシルバニア大学の受託者

Wilson、James M.

Fisher、Krishna J.

Gao、Guang-Ping

(ii) 発明の名称：組み換えアデノウイルス及びアデノ随伴ウ

イルス、細胞系並びに生産方法及びその使

用

(iii) 配列の数：5

(iv) 通信住所：

(A) 受信人：Howson及びHowson

(B) 通り：私書箱457、321ノリスタウン通り (N

orristown Road)

(C) 市：スプリングハウス (Spring Hou

se)

(D) 州：ペンシルバニア (PA)

(E) 国：米国 (USA)

(F) 郵便番号：19477

(v) コンピューター可読形態

(A) 媒質型：フロッピーディスク

(B) コンピューター：IBM PC互換性

(C) オペレーティングシステム：PC-DOS/MS

-DOS

(D) ソフトウェア : Patent In Release

e 1.0 バージョン 1.30

(v i) 現在の出願データ :

(A) 出願番号 : WO

(B) 申請日 :

(C) 分類 :

(v i i) 先行する出願データ :

(A) 出願番号 : US 08/462,014

(B) 申請日 : 1995年6月5日

(v i i) 先行する出願データ :

(A) 出願番号 : US 08/549,489

(B) 申請日 : 1995年10月27日

(v i i i) 弁護士/代理人の情報 :

(A) 氏名 : Bak, Mary E.

(B) 登録番号 : 31,215

(C) 証明書/認可証番号 : GNVPN012CIPP

CT

(i x) 遠距離通信の情報 :

(A) 電話 : (215) 540-9206

(B) ファックス : (215) 540-5818

(2) 配列番号1の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 3653塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：関係なし

(i i) 配列の種類：cDNA

(i x) 配列の特徴：

(A) 名称／特徴を表す記号：CDS

(B) 存在位置：1521...2405

(x i) 配列：配列番号1

CTGCATGTGT CAGAGGTTTT CACCGTCATC ACCGAAACGC GCGAGGCAGC	50
AAGCTTGGCA GAAATGGTTG AACTCCCGAG AGTGTCCCTAC ACCTAGGGGA	100
GAAGCAGCCA AGGGGTGTGT TCCACCAAG GACGACCCGT CTGCGCACAA	150
ACGGATGAGC CCATCAGACA AAGACATATT CATTCTCTGC TGCAAACCTG	200
GCATAGCTCT GCTTTGCCTG GGGCTATTGG GGGAAAGTTGC GGTTCGTGCT	250
CGCAGGGCTC TCACCCTTGA CTCTTTCAAT AATAACTCTT CTGTGCAAGA	300
TTACAATCTA AACCAATTCGG AGAACTCGAC CTTCCCTCCTG AGGCAAGGAC	350
CACAGCCAAC TTCCTCTTAC AAGCCGCATC GATTTTGTCC TTCAGAAATA	400
GAAATAAGAA TGCTTGCTAA AAATTATATT TTTACCAATA AGACCAATCC	450
AATAGGTAGA TTATTAGTTA CTATGTAAAG AAATGAATCA TTATCTTTTA	500
GTACTATTTT TACTCAAATT CAGAAGTTAG AAATGGGAAT AGAAAATAGA	550
AAGAGACGCT CAACCTCAAT TGAAGAACAG GTGCAAGGAC TATTGACCAC	600
AGGCCTAGAA GTAAAAAAGG GAAAAAAGAG TGTTTTGTGC AAAATAGGAG	650
ACAGGTGGTG GCAACCAGGG ACTTATAGGG GACCTTACAT CTACAGACCA	700
ACAGATGCCC CCTTACCATA TACAGGAAGA TATGACTTAA ATTGGGATAG	750
GTGGGTACA GTCAATGGCT ATAAAGTGTT ATATAGATCC CTCCCCTTTC	800
GTGAAAGACT CGCCAGAGCT AGACCTCCTT GGTGTATGTT GTCTCAAGAA	850
AAGAAAGACG ACATGAAACA ACAGGTACAT GATTATATTT ATCTAGGAAC	900

AGGAATGCAC	TTTTGGGGAA	AGATTTTCCA	TACCAAGGAG	GGGACAGTGG	950
CTGGACTAAT	AGAACATTAT	TCTGCAAAAA	CTTATGGCAT	GAGTTATTAT	1000
GATTAGCCTT	GATTTGCCCCA	ACCTTGCGGT	TCCCAAGGCT	TAAGTAAGTT	1050
TTTGGTTACA	AACTGTTCTT	AAAACAAGGA	TGTGAGACAA	GTGGTTTCCT	1100
GACTTGGTTT	GGTATCAAAG	GTTCTGATCT	GAGCTCTGAG	TGTTCTATTT	1150
TCCTATGTTC	TTTTGGAATT	TATCCAAATC	TTATGTAAAT	GCTTATGTAA	1200
ACCAAGATAT	AAAAGAGTGC	TGATTTTTTG	AGTAAACTTG	CAACAGTCCT	1250
AACATTACAC	TCTTGTGTGT	TTGTGTCTGT	TCGCCATCCC	GTCTCCGCTC	1300
GTCACCTATC	CTTCACTTTC	CAGAGGGTCC	CCCCGCAGAC	CCCGGCGACC	1350
CTCAGGTCGG	CCGACTGCGG	CAGCTGGCGC	CCGAACAGGG	ACCCTCGGAT	1400
AAGTGACCCT	TGTCTTTATT	TCTACTATTT	TGTGTTTCGTC	TTGTTTTGTC	1450
TCTATCTTGT	CTGGCTATCA	TCACAAGAGC	GGAACGGACT	CACCTCAGGG	1500
AACCAAGCTA	GCCCAATTCTG	ATGACTACGT	CCGGCGTTCC	ATTGCGCATG	1550
ACACTACGAC	CAACACGATC	TCGGTTGTCT	CGGCGCACTC	CGTACAGTAG	1600
GGATCGTCTA	CCTCCTTTTG	AGACAGAAAC	CCGCGCTACC	ATACTGGAGG	1650
ATCATCCGCT	GCTGCCCCGAA	TGTAACACTT	TGACAATGCA	CAACGTGAGT	1700
TACGTGCGAG	GTCTTCCCTG	CAGTGTGGGA	TTTACGCTGA	TTCAGGAATG	1750
GGTTGTTCCC	TGGGATATGG	TTCTAACGCG	GGAGGAGCTT	GTAATCCTGA	1800
GGAAGTGTAT	GCACGTGTGC	CTGTGTTGTG	CCAACATTGA	TATCATGACG	1850
AGCATGATGA	TCCATGGTTA	CGAGTCCTGG	GCTCTCCACT	GTCATTGTTC	1900
CAGTCCCAGT	TCCCTGCAGT	GTATAGCCGG	CGGGCAGGTT	TTGGCCAGCT	1950
GGTTTAGGAT	GGTGGTGGAT	GGCGCCATGT	TTAATCAGAG	GTTTATATGG	2000
TACCGGGAGG	TGGTGAATTA	CAACATGCCA	AAAGAGGTAA	TGTTTATGTC	2050
CAGCGTGTTT	ATGAGGGGTC	GCCACTTAAT	CTACCTGCGC	TTGTGGTATG	2100
ATGGCCACGT	GGGTTCTGTG	GTCCCCGCCA	TGAGCTTTGG	ATACAGCGCC	2150
TTGCACTGTG	GGATTTTGAA	CAATATTGTG	GTGCTGTGCT	GCAGTTACTG	2200

TGCTGATTTA	AGTGAGATCA	GGGTGCGCTG	CTGTGCCCCG	AGGACAAGGC	2250
GCCTTATGCT	GCGGGCGGTG	CGAATCATCG	CTGAGGAGAC	CACTGCCATG	2300
TTGTATTTCCT	GCAGGACGGA	GCGGCGGCGG	CAGCAGTTTA	TTCGCGCGCT	2350
GCTGCAGCAC	CACCGCCCTA	TCCTGATGCA	CGATTATGAC	TCTACCCCCA	2400
TGTAGGGATC	CAAGCTTGCG	GGCGCATCGA	TGATATCAAG	CTTGCGATGCC	2450
TGCAGGTCGA	CTCTAGAGGA	TCCCGGGTGG	NATCCCTGTG	ACCCCTCCCC	2500
AGTGCCTCTC	CTGGCCCTGG	AAGTTGGCAC	TCCAGTGCCC	ACCAGCCTTG	2550
TCCTAATAAA	ATTAAGTTGN	ATCATTTTGT	CTGACTAGGT	GTCCTTCTAT	2600
AATATTATGG	GGTGGAGGGG	GGTGGTATCG	AGCAANGGGN	AANTTGGNAA	2650
GACAANCTGT	AGGGCCTGCG	GGGTCTATTG	GGAACAAGCT	GGAGTGCAGT	2700
GGCACAATCT	TGGCTCACTG	CAATCTCCGC	CTCCTGGGTT	CAAGCGATTC	2750
TCCTGCCTCA	GACTCCCGAG	TTGTTGGGAT	TCCAGGCATG	CATGACCAGG	2800
CTCAGATAAT	TTTTGTTTT	TTGGTAGAGA	CGGGGTTTCA	CCATATTGGN	2850
CAGGCTGGTC	TCCAACCTCT	AATCTCAGGT	GATCTNCCCA	CCTTGGCCTC	2900
CCAAATTGCT	GGGATTACAG	GNGTGAACCA	CTGNTCCCTT	CCCTGTCTTT	2950
CTGATTTTAA	AATAACTATA	CCAGCAGGAG	GACGTCCAGA	CACAGCATAG	3000
GCTACCTGGC	CATGCCCAAC	CGGTGGGACA	TTTGAGTTGC	TTGCTTGGCA	3050
CTGTCTCTC	ATGCGTTGGG	TCCACTCAGT	AGATGCCTGT	TGAATTGGGT	3100
ACGCGGCCAG	CTTGGCTGTG	GAATGTGTGT	CAGTTAGGGT	GTGGAAAGTC	3150
CCCAGGCTCC	CCAGCAGGCA	GAAGTATGCA	AAGCATGCAT	CTCAATTAGT	3200
CAGCAACCAG	GTGTGGAAAG	TCCCCAGGCT	CCCCAGCAGG	CAGAAGTATG	3250
CAAAGCATGC	ATCTCAATTA	GTCAGNAACC	ATAGNCCCGC	CCCTAACTCC	3300
GTCCATCCCG	GCCCTAACTC	NGGCCAGTTC	CGACCNCT	CCGGCANNATG	3350
GNTGAGTAAT	TTGCNNGATT	TATGCAGNGG	GCGAGGNCGC	CTCGGGCTCT	3400
GAGNTNTTCC	AGAAGTAGTG	AGGAGGCTTT	NNTGGTGGAA	TTGATCAGCT	3450
TGGGATCTGA	TCAAGAGACA	GGATGAGGAT	CGNNNCGNAT	GATTGAACAA	3500

GATGGGTTGC ACGGAGGTTC TCCGGNCGCT TGGGTGGGGA GGNTATTCGG 3550
 NTATTNTTGG TGNACAACAG NNAAACGGNT GTTCTGATGC CGCCGCGTTC 3600
 NCGCTTTCAG NGCAGGGGGG CCCCCCTTCT NTTGAGANNA GCNCCCCTTN 3650
 TTG 3653

(2) 配列番号2の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 294アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 関係なし

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列: 配列番号2

Met	Thr	Thr	Ser	Gly	Val	Pro	Phe	Gly	Met	Thr	Leu	Arg	Pro	Thr	Arg	1	5	10	15
Ser	Arg	Leu	Ser	Arg	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ser	Arg	Asp	Arg	Leu	Pro	Pro	20	25	30	
Phe	Glu	Thr	Glu	Thr	Arg	Ala	Thr	Ile	Leu	Glu	Asp	His	Pro	Leu	Leu	35	40	45	
Pro	Glu	Cys	Asn	Thr	Leu	Thr	Met	His	Asn	Val	Ser	Tyr	Val	Arg	Gly	50	55	60	
Leu	Pro	Cys	Ser	Val	Gly	Phe	Thr	Leu	Ile	Gln	Glu	Trp	Val	Val	Pro	65	70	75	80
Trp	Asp	Met	Val	Leu	Thr	Arg	Glu	Glu	Leu	Val	Ile	Leu	Arg	Lys	Cys	85	90	95	
Met	His	Val	Cys	Leu	Cys	Cys	Ala	Asn	Ile	Asp	Ile	Met	Thr	Ser	Met	100	105	110	
Met	Ile	Tyr	Gly	Tyr	Glu	Ser	Trp	Ala	Leu	His	Cys	His	Cys	Ser	Ser	115	120	125	
Pro	Gly	Ser	Leu	Gln	Cys	Ile	Ala	Gly	Gly	Gln	Val	Leu	Ala	Ser	Trp	130	135	140	
Phe	Arg	Met	Val	Val	Asp	Gly	Ala	Met	Phe	Asn	Gln	Arg	Phe	Ile	Trp	145	150	155	150

Tyr Arg Glu Val Val Asn Tyr Asn Met Pro Lys Glu Val Met Phe Met
 165 170 175
 Ser Ser Val Phe Met Arg Gly Arg His Leu Ile Tyr Leu Arg Tyr Trp
 180 185 190
 Tyr Asp Gly His Val Gly Ser Val Val Pro Ala Met Ser Phe Gly Tyr
 195 200 205
 Ser Ala Leu His Cys Gly Ile Leu Asn Asn Ile Val Val Leu Cys Cys
 210 215 220
 Ser Tyr Cys Ala Asp Leu Ser Glu Ile Arg Val Arg Cys Cys Ala Arg
 225 230 235 240
 Arg Thr Arg Arg Leu Met Leu Arg Ala Val Arg Ile Ile Ala Glu Glu
 245 250 255
 Thr Thr Ala Met Leu Tyr Ser Cys Arg Thr Glu Arg Arg Arg Gln Gln
 260 265 270
 Phe Ile Arg Ala Leu Leu Gln His His Arg Pro Ile Leu Met His Asp
 275 280 285
 Tyr Asp Ser Thr Pro Met
 290

(2) 配列番号3の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 35408塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 関係なし

(D) トポロジー: 関係なし

(ii) 配列の種類: 他の核酸

(xi) 配列: 配列番号3

CATCATCAAT AATATACCTT ATTTTGGATT GAAGCCAATA TGATAATGAG	50
GGGGTGGAGT TTGTGACGTG GCGCGGGGCG TGGGAACGGG GCGGGTGACG	100
TAGTAGTGTG GCGGAAGTGT GATGTTGCAA GTGTGGCGGA ACACATGTAA	150
GCGACGGATG TGGCAAAAGT GACGTTTTTG GTGTGCGCCG GTGTACACAG	200
GAAGTGACAA TTTTCGCGCG GTTTTAGGCG GATGTTGTAG TAAATTTGGG	250
CGTAACCGAG TAAGATTTGG CCATTTTCGC GGGAAACTG AATAAGAGGA	300

AGTGAAATCT	GAATAATTTT	GTGTTACTCA	TAGCGCGTAA	TATTTGTCTA	350
GGGAGATCAG	CCTGCAGGTC	GTTACATAAC	TTACGGTAAA	TGGCCCGCCT	400
GGCTGACCGC	CCAACGACCC	CCGCCCATTG	ACGTCAATAA	TGACGTATGT	450
TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	TTGACGTCAA	TGGGTGGAGT	500
ATTTACGGTA	AACTGCCCCAC	TTGGCAGTAC	ATCAAGTGTA	TCATATGCCA	550
AGTACGCCCC	CTATTGACGT	CAATGACGGT	AAATGGCCCCG	CCTGGCATT	600
TGCCCAGTAC	ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGCAG	TACATCTACT	650
CGAGGCCACG	TTCTGCTTCA	CTCTCCCCAT	CTCCCCCCCC	TCCCCACCCC	700
CAATTTTGTA	TTTATTTATT	TTTTAATTAT	TTTGTGCAGC	GATGGGGGCG	750
GGGGGGGGGG	GGGGGCGCGC	GCCAGGCGGG	GCGGGGCGGG	GCGAGGGGCG	800
GGGCGGGGCG	AGGCGGAGAG	GTGCGGCGGC	AGCCAATCAG	AGCGGCGCGC	850
TCCGAAAGTT	TCCTTTTATG	GCGAGGCGGC	GGCGGCGGGC	GCCCTATAAA	900
AAGCGAAGCG	CGCGGCGGGC	GGGAGCGGGA	TCAGCCACCG	CGGTGGCGGC	950
CGCAATTCCC	GGGGATCGAA	AGAGCCTGCT	AAAGCAAAAA	AGAAGTCACC	1000
ATGTCGTTTA	CTTTGACCAA	CAAGAACGTG	ATTTTCGTTG	CCGGTCTGGG	1050
AGGCATTGGT	CTGGACACCA	GCAAGGAGCT	GCTCAAGCGC	GATCCCGTCG	1100
TTTTACAACG	TCGTGACTGG	GAAAACCCTG	GCGTTACCCA	ACTTAATCGC	1150
CTTGCAGCAC	ATCCCCCTTT	CGCCAGCTGG	CGTAATAGCG	AAGAGGCCCG	1200
CACCGATCGC	CCTTCCCAAC	AGTTGCGCAG	CCTGAATGGC	GAATGGCGCT	1250
TTGCCTGGTT	TCCGGCACCA	GAAGCGGTGC	CGGAAAGCTG	GCTGGAGTGC	1300
GATCTTCCTG	AGGCCGATAC	TGTCGTCGTC	CCCTCAAAC	GGCAGATGCA	1350
CGGTACGAT	GCGCCCATCT	ACACCAACGT	AACCTATCCC	ATTACGGTCA	1400
ATCCGCCGTT	TGTTCCACG	GAGAATCCGA	CGGGTTGTTA	CTCGCTCACA	1450
TTTAATGTTG	ATGAAAGCTG	GCTACAGGAA	GGCCAGACGC	GAATTATTTT	1500
TGATGGCGTT	AACTCGGCGT	TTCATCTGTG	GTGCAACGGG	CGCTGGGTGG	1550
GTTACGGCCA	GGACAGTCGT	TTGCCGTCTG	AATTTGACCT	GAGCGCATTT	1600

TTACGCGCCG	GAGAAAACCG	CCTCGCGGTG	ATGGTGCTGC	GTTGGAGTGA	1650
CGGCAGTTAT	CTGGAAGATC	AGGATATGTG	GCGGATGAGC	GGCATTTTCC	1700
GTGACGTCTC	GTTGCTGCAT	AAACCGACTA	CACAAATCAG	CGATTTCAT	1750
GTTGCCACTC	GCTTTAATGA	TGATTTCAGC	CGCGCTGTAC	TGGAGGCTGA	1800
AGTTCAGATG	TGCGGCGAGT	TGCGTGACTA	CCTACGGGTA	ACAGTTTCTT	1850
TATGGCAGGG	TGAAACGCAG	GTCGCCAGCG	GCACCGCGCC	TTTCGGCGGT	1900
GAAATTATCG	ATGAGCGTGG	TGGTTATGCC	GATCGCGTCA	CACTACGTCT	1950
GAACGTCGAA	AACCCGAAAC	TGTGGAGCGC	CGAAATCCCG	AATCTCTATC	2000
GTGCGGTGGT	TGAACTGCAC	ACCGCCGACG	GCACGCTGAT	TGAAGCAGAA	2050
GCCTGCGATG	TCGGTTTCCG	CGAGGTGCGG	ATTGAAAATG	GTCTGCTGCT	2100
GCTGAACGGC	AAGCCGTTGC	TGATTCGAGG	CGTTAACCGT	CACGAGCATC	2150
ATCCTCTGCA	TGGTCAGGTC	ATGGATGAGC	AGACGATGGT	GCAGGATATC	2200
CTGCTGATGA	AGCAGAACAA	CTTTAACGCC	GTGCGCTGTT	CGCATTATCC	2250
GAACCATCCG	CTGTGGTACA	CGCTGTGCGA	CCGCTACGGC	CTGTATGTGG	2300
TGGATGAAGC	CAATATTGAA	ACCCACGGCA	TGGTGCCAAT	GAATCGTCTG	2350
ACCGATGATC	CGCGCTGGCT	ACCGGCGATG	AGCGAACGCG	TAACGCGAAT	2400
GGTGCAGCGC	GATCGTAATC	ACCCGAGTGT	GATCATCTGG	TCGCTGGGGA	2450
ATGAATCAGG	CCACGGCGCT	AATCACGACG	CGCTGTATCG	CTGGATCAAA	2500
TCTGTGATC	CTTCCCGCCC	GGTGCAGTAT	GAAGGCGGCG	GAGCCGACAC	2550
CACGGCCACC	GATATTATTT	GCCCGATGTA	CGCGCGCGTG	GATGAAGACC	2600
AGCCCTTCCC	GGCTGTGCCG	AAATGGTCCA	TCAAAAATG	GCTTTCGCTA	2650
CCTGGAGAGA	CGCGCCCGCT	GATCCTTTGC	GAATACGCCC	ACGCGATGGG	2700
TAACAGTCTT	GGCGGTTTCG	CTAAATACTG	GCAGGCGTTT	CGTCAGTATC	2750
CCCGTTTACA	GGGCGGCTTC	GTCTGGGACT	GGGTGGATCA	GTCGCTGATT	2800
AAATATGATG	AAAACGGCAA	CCCGTGGTCG	GCTTACGGCG	GTGATTTTGG	2850
CGATACGCCG	AACGATCGCC	AGTTCTGTAT	GAACGCTCTG	GTCTTTGCCG	2900

ACCGCACGCC	GCATCCAGCG	CTGACGGAAG	CAAAACACCA	GCAGCAGTTT	2950
TTCCAGTTCC	GTTTATCCGG	GCAAACCATC	GAAGTGACCA	GCGAATACCT	3000
GTTCCGTCAT	AGCGATAACG	AGCTCCTGCA	CTGGATGGTG	GCGCTGGATG	3050
GTAAGCCGCT	GGCAAGCGGT	GAAGTGCCCTC	TGGATGTTCG	TCCACAAGGT	3100
AAACAGTTGA	TTGAACTGCC	TGAACTACCG	CAGCCGGAGA	GCGCCGGGCA	3150
ACTCTGGCTC	ACAGTACGCG	TAGTGCAACC	GAACGCGACC	GCATGGTCAG	3200
AAGCCGGGCA	CATCAGCGCC	TGGCAGCAGT	GGCGTCTGGC	GGAAAACCTC	3250
AGTGTGACGC	TCCCCGCCGC	GTCCCACGCC	ATCCCGCATC	TGACCACCAG	3300
CGAAATGGAT	TTTTGCATCG	AGCTGGGTAA	TAAGCGTTGG	CAATTTAACC	3350
GCCAGTCAGG	CTTCTTTTCA	CAGATGTGGA	TTGGCGATAA	AAAACAACTG	3400
CTGACGCCGC	TGCGCGATCA	GTTCACCCGT	GCACCGCTGG	ATAACGACAT	3450
TGGCGTAAGT	GAAGCGACCC	GCATTGACCC	TAACGCCTGG	GTCGAACGCT	3500
GGAAGGCGGC	GGGCCATTAC	CAGGCCGAAG	CAGCGTTGTT	GCAGTGCACG	3550
GCAGATACAC	TTGCTGATGC	GGTGCTGATT	ACGACCGCTC	ACGCGTGGCA	3600
GCATCAGGGG	AAAACCTTAT	TTATCAGCCG	GAAAACCTAC	CGGATTGATG	3650
GTAGTGGTCA	AATGGCGATT	ACCGTTGATG	TTGAAGTGGC	GAGCGATACA	3700
CCGCATCCGG	CGCGGATTGG	CCTGAACTGC	CAGCTGGCGC	AGGTAGCAGA	3750
GCGGGTAAAC	TGGCTCGGAT	TAGGGCCGCA	AGAAAACCTAT	CCCGACCGCC	3800
TTACTGCCGC	CTGTTTGTAC	CGCTGGGATC	TGCCATTGTC	AGACATGTAT	3850
ACCCCGTACG	TCTTCCCGAG	CGAAAACGGT	CTGCGCTGCG	GGACGCGCGA	3900
ATTGAATTAT	GGCCCACACC	AGTGGCGCGG	CGACTTCCAG	TTCAACATCA	3950
GCCGCTACAG	TCAACAGCAA	CTGATGGAAA	CCAGCCATCG	CCATCTGCTG	4000
CACGCGGAAG	AAGGCACATG	GCTGAATATC	GACGGTTTCC	ATATGGGGAT	4050
TGGTGGCGAC	GACTCCTGGA	GCCCCTCAGT	ATCGGCGGAA	TTACAGCTGA	4100
GCGCCGGTCG	CTACCATTAC	CAGTTGGTCT	GGTGTCAAAA	ATAATAATAA	4150
CCGGGCAGGC	CATGTCTGCC	CGTATTTTCG	GTAAGGAAAT	CCATTATGTA	4200

CTATTTAAAA AACACAAACT TTTGGATGTT CGGTTTATTC TTTTCTTTT	4250
ACTTTTTTAT CATGGGAGCC TACTTCCCGT TTTTCCCGAT TTGGCTACAT	4300
GACATCAACC ATATCAGCAA AAGTGATACG GGTATTATTT TTGCCGCTAT	4350
TTCTCTGTTT TCGCTATTAT TCCAACCGCT GTTGGTCTG CTTTCTGACA	4400
AACTCGGCCT CGACTCTAGG CGGCCGCGGG GATCCAGACA TGATAAGATA	4450
CATTGATGAG TTTGGACAAA CCACAACCTAG AATGCAGTGA AAAAAATGCT	4500
TTATTTGTGA AATTTGTGAT GCTATTGCTT TATTTGTAAC CATTATAAGC	4550
TGCAATAAAC AAGTTAACAA CAACAATTGC ATTCATTTTA TGTTTCAGGT	4600
TCAGGGGGAG GTGTGGGAGG TTTTTCGGA TCCTCTAGAG TCGACCTGCA	4650
GGCTGATCAG TGGAAGGTGC TGAGGTACGA TGAGACCCGC ACCAGGTGCA	4700
GACCCCTGCGA GTGTGGCGGT AAACATATTA GGAACCAGCC TGTGATGCTG	4750
GATGTGACCG AGGAGCTGAG GCCCGATCAC TTGGTGCTGG CCTGCACCCG	4800
CGCTGAGTTT GGCTCTAGCG ATGAAGATAC AGATTGAGGT ACTGAAATGT	4850
GTGGGCGTGG CTTAAGGGTG GGAAAGAATA TATAAGGTGG GGGTCTTATG	4900
TAGTTTGTGA TCTGTTTTGC AGCAGCCGCC GCCGCCATGA GCACCAACTC	4950
GTTTGATGGA AGCATTGTGA GCTCATATTT GACAACGCGC ATGCCCCCAT	5000
GGGCCGGGGT GCGTCAGAAAT GTGATGGGCT CCAGCATTGA TGGTCGCCCC	5050
GTCTTGCCCG CAAACTCTAC TACCTTGACC TACGAGACCG TGTCTGGAAC	5100
GCCGTGGAG ACTGCAGCCT CCGCCGCCGC TTCAGCCGCT GCAGCCACCG	5150
CCCGCGGGAT TGTGACTGAC TTTGCTTTCC TGAGCCCGCT TGCAAGCAGT	5200
GCAGCTTCCC GTTCATCCGC CCGCGATGAC AAGTTGACGG CTCTTTTGGC	5250
ACAATTGGAT TCTTTGACCC GGGAACTTAA TGTGTTTCT CAGCAGCTGT	5300
TGGATCTGCG CCAGCAGGTT TCTGCCCTGA AGGCTTCCTC CCCTCCCAAT	5350
GCGGTTTAAA ACATAAATAA AAAACCAGAC TCTGTTTGA TTTGGATCAA	5400
GCAAGTGTCT TGCTGTCTTT ATTTAGGGGT TTTGCGCGCG CGGTAGGCCC	5450
GGGACCAGCG GTCTCGGTCTG TTGAGGGTCC TGTGTATTTT TTCCAGGACG	5500

TGGTAAAGGT	GACTCTGGAT	G TTCAGATAC	ATGGGCATAA	GCCCGTCTCT	5550
GGGGTGGAGG	TAGCACCAC	GCAGAGCTTC	ATGCTGCGGG	GTGGTGTTGT	5600
AGATGATCCA	GTCGTAGCAG	GAGCGCTGGG	CGTGGTGCCCT	AAAAATGTCT	5650
TTCAGTAGCA	AGCTGATTGC	CAGGGGCAGG	CCCTTGGTGT	AAGTGTTTAC	5700
AAAGCGGTTA	AGCTGGGATG	GGTGATACG	TGGGGATATG	AGATGCATCT	5750
TGGACTGTAT	TTTTAGGTTG	GCTATGTTCC	CAGCCATATC	CCTCCGGGGA	5800
TTCATGTTGT	GCAGAACCCAC	CAGCACAGTG	TATCCGGTGC	ACTTGGGAAA	5850
TTTGTCATGT	AGCTTAGAAG	GAAATGCGTG	GAAGAACTTG	GAGACGCCCT	5900
TGTGACCTCC	AAGATTTTCC	ATGCATTTCG	CCATAATGAT	GGCAATGGGC	5950
CCACGGGCGG	CGGCCTGGGC	GAAGATATTT	CTGGGATCAC	TAACGTCATA	6000
GTTGTGTTCC	AGGATGAGAT	CGTCATAGGC	CATTTTTTACA	AAGCGCGGGC	6050
GGAGGGTGCC	AGACTGCGGT	ATAATGGTTC	CATCCGGCCC	AGGGGCGTAG	6100
TTACCCTCAC	AGATTTGCAT	TTCCACGCT	TTGAGTTCAG	ATGGGGGGAT	6150
CATGTCTACC	TGCGGGGCGA	TGAAGAAAAC	GGTTTCCGGG	G TAGGGGAGA	6200
TCAGCTGGGA	AGAAAGCAGG	TTCCTGAGCA	GCTGCGACTT	ACCGCAGCCG	6250
GTGGGCCCCG	AAATCACACC	TATTACCGGG	TGCAACTGGT	AGTTAAGAGA	6300
GCTGCAGCTG	CCGTCATCCC	TGAGCAGGGG	GGCCACTTCG	TTAAGCATGT	6350
CCCTGACTCG	CATGTTTTCC	CTGACCAAAT	CCGCCAGAAG	GCGCTCGCCG	6400
CCCAGCGATA	GCAGTTCTTG	CAAGGAAGCA	AAGTTTTTCA	ACGGTTTGAG	6450
ACCGTCCGCC	G TAGGCATGC	TTTTGAGCGT	TTGACCAAGC	AGTTCCAGGC	6500
GGTCCACAG	CTCGGTCACC	TGCTCTACGG	CATCTCGATC	CAGCATATCT	6550
CCTCGTTTCG	CGGGTTGGGG	CGGCTTTCGC	TGTACGGCAG	TAGTCGGTGC	6600
TCGTCCAGAC	GGGCCAGGGT	CATGTCTTTC	CACGGGCGCA	GGGTCCTCGT	6650
CAGCGTAGTC	TGGGTCACGG	TGAAGGGGTG	CGCTCCGGGC	TGCGCGCTGG	6700
CCAGGGTGCG	CTTGAGGCTG	GTCCTGCTGG	TGCTGAAGCG	CTGCCGGTCT	6750
TCGCCCTGCG	CGTCGGCCAG	G TAGCATTTG	ACCATGGTGT	CATAGTCCAG	6800

CCCCCTCCGCG	GCGTGGCCCT	TGGCGCGCAG	CTTGCCCTTG	GAGGAGGCGC	6850
CGCACGAGGG	GCAGTGCAGA	CTTTTGAGGG	CGTAGAGCTT	GGGCGCGAGA	6900
AATACCGATT	CCGGGGAGTA	GGCATCCGCG	CCGCAGGCC	CGCAGACGGT	6950
CTCGCATTC	ACGAGCCAGG	TGAGCTCTGG	CCGTTCGGGG	TCAAAAACCA	7000
GGTTTCCCCC	ATGCTTTTGT	ATGCGTTTCT	TACCTCTGGT	TTCCATGAGC	7050
CGGTGTCCAC	GCTCGGTGAC	GAAAAGGCTG	TCCGTGTCCC	CGTATACAGA	7100
CTTGAGAGGC	CTGTCCTCGA	GCGGTGTTCC	GCGGTCCTCC	TCGTATAGAA	7150
ACTCGGACCA	CTCTGAGACA	AAGGCTCGCG	TCCAGGCCAG	CACGAAGGAG	7200
GCTAAGTGGG	AGGGGTAGCG	GTCGTTGTCC	ACTAGGGGGT	CCACTCGCTC	7250
CAGGGTGTGA	AGACACATGT	CGCCCTCTTC	GGCATCAAGG	AAGGTGATTG	7300
GTTTGTAGGT	GTAGGCCACG	TGACCGGGTG	TTCCTGAAGG	GGGGCTATAA	7350
AAGGGGGTGG	GGGCGCGTTC	GTCCTCACTC	TCTTCCGCAT	CGCTGTCTGC	7400
GAGGGCCAGC	TGTTGGGGTG	AGTACTCCCT	CTGAAAAGCG	GGCATGACTT	7450
CTGCGCTAAG	ATTGTCAGTT	TCCAAAAACG	AGGAGGATTT	GATATTCACC	7500
TGGCCCCGCG	TGATGCCTTT	GAGGGTGGCC	GCATCCATCT	GGTCAGAAAA	7550
GACAATCTTT	TTGTTGTCAA	GCTTGGTGGC	AAACGACCCG	TAGAGGGCGT	7600
TGGACAGCAA	CTTGGCGATG	GAGCGCAGGG	TTTGGTTTTT	GTCGCGATCG	7650
GCGCGCTCCT	TGGCCGCGAT	GTTTAGCTGC	ACGTATTTCG	GCGCAACGCA	7700
CCGCCATTCC	GGAAAGACGG	TGGTGCGCTC	GTCGGGCACC	AGGTGCACGC	7750
GCCAACCGCG	GTTGTGCAGG	GTGACAAGGT	CAACGCTGGT	GGCTACCTCT	7800
CCGCGTAGGC	GCTCGTTGGT	CCAGCAGAGG	CGGCCGCCCT	TGCGCGAGCA	7850
GAATGGCGGT	AGGGGGTCTA	GCTGCGTCTC	GTCCGGGGGG	TCTGCGTCCA	7900
CGGTAAAGAC	CCCGGGCAGC	AGGCGCGCGT	CGAAGTAGTC	TATCTTGCA	7950
CCTTGCAAGT	CTAGCGCCTG	CTGCCATGCG	CGGGCGGCAA	GCGCGCGCTC	8000
GATAGGGTTG	AGTGGGGGAC	CCCATGGCAT	GGGGTGGGTG	AGCGCGGAGG	8050
CGTACATGCC	GCAAATGTCT	TAAACGTAGA	GGGGCTCTCT	GAGTATTCCA	8100

AGATATGTAG	GGTAGCATCT	TCCACCGCGG	ATGCTGGCGC	GCACGTAATC	8150
GTATAGTTCC	TGCGAGGGAG	CGAGGAGGTC	GGGACCGAGG	TTGCTACGGG	8200
CGGGCTGCTC	TGCTCGGAAG	ACTATCTGCC	TGAAGATGGC	ATGTGAGTTG	8250
GATGATATGG	TTGGACGCTG	GAAGACGTTG	AAGCTGGCGT	CTGTGAGACC	8300
TACCGCGTCA	CGCACGAAGG	AGGCGTAGGA	GTCGCGCAGC	TTGTTGACCA	8350
GCTCGGCGGT	GACCTGCACG	TCTAGGGCGC	AGTAGTCCAG	GGTTTCCTTG	8400
ATGATGTCAT	ACTTATCCTG	TCCCTTTTTT	TTCCACAGCT	CGCGGTTGAG	8450
GACAACTCT	TCGCGGTCTT	TCCAGTACTC	TTGGATCGGA	AACCCGTCGG	8500
CCTCCGAACG	GTAAGAGCCT	AGCATGTAGA	ACTGGTTGAC	GGCCTGGTAG	8550
GCGCAGCATC	CCTTTTCTAC	GGGTAGCGCG	TATGCCTGCG	CGGCCTTCCG	8600
GAGCGAGGTG	TGGGTGAGCG	CAAAGGTGTC	CCTGACCATG	ACTTTGAGGT	8650
ACTGGTATTT	GAAGTCAGTG	TCGTCGCATC	CGCCCTGCTC	CCAGAGCAAA	8700
AAGTCCGTGC	GCTTTTTTGA	ACGCGGATTT	GGCAGGGCGA	AGGTGACATC	8750
GTTGAAGAGT	ATCTTTCCCG	CGCGAGGCAT	AAAGTTGCGT	GTGATGCGGA	8800
AGGGTCCCGG	CACCTCGGAA	CGGTTGTAA	TTACCTGGGC	GGCGAGCACG	8850
ATCTCGTCAA	AGCCGTTGAT	GTTGTGGCCC	ACAATGTAAA	GTTCCAAGAA	8900
GCGCGGGATG	CCCTTGATGG	AAGGCAATTT	TTTAAGTTCC	TCGTAGGTGA	8950
GCTCTTCAGG	GGAGCTGAGC	CCGTGCTCTG	AAAGGGCCCA	GTCTGCAAGA	9000
TGAGGGTTGG	AAGCGACGAA	TGAGCTCCAC	AGGTACAGGG	CCATTAGCAT	9050
TTGCAGGTGG	TCGCGAAAGG	TCCTAAACTG	GCGACCTATG	GCCATTTTTT	9100
CTGGGGTGAT	GCAGTAGAAG	GTAAGCGGGT	CTTGTTCCCA	GCGGTCCCAT	9150
CCAAGGTTCC	CGGCTAGGTC	TCGCGCGGCA	GTCACTAGAG	GCTCATCTCC	9200
GCCGAACTTC	ATGACCAGCA	TGAAGGGCAC	GAGCTGCTTC	CCAAAGGCCC	9250
CCATCCAAGT	ATAGGTCTCT	ACATCGTAGG	TGACAAAGAG	ACGCTCGGTG	9300
CGAGGATGCG	AGCCGATCGG	GAAGAACTGG	ATCTCCCGCC	ACCAATTGGA	9350
GGAGTGGCTA	TTGATGTGGT	GAAAGTAGAA	GTCCTGCGA	CGGGCCGAAC	9400

ACTCGTGCTG	GCTTTTGTA	AAACGTGCGC	AGTACTGGCA	GCGGTGCACG	9450
GGCTGTACAT	CCTGCACGAG	GTTGACCTGA	CGACCGCGCA	CAAGGAAGCA	9500
GAGTGGGAAT	TTGAGCCCCT	CGCCTGGCGG	GTTTGGCTGG	TGGTCTTCTA	9550
CTTCGGCTGC	TTGTCCTTGA	CCGTCTGGCT	GCTCGAGGGG	AGTTACGGTG	9600
GATCGGACCA	CCACGCCGCG	CGAGCCCAA	GTCCAGATGT	CCGCGCGCGG	9650
CGGTCCGAGC	TTGATGACAA	CATCGCGCAG	ATGGGAGCTG	TCCATGGTCT	9700
GGAGCTCCCG	CGGCGTCAGG	TCAGGCGGGA	GCTCCTGCAG	GTTTACCTCG	9750
CATAGACGGG	TCAGGCGCGG	GGCTAGATCC	AGGTGATACC	TAATTTCCAG	9800
GGGCTGGTTG	GTGGCGGCGT	CGATGGCTTG	CAAGAGGCCG	CATCCCCGCG	9850
GCGCGACTAC	GGTACCGCGC	GGCGGGCGGT	GGGCCGCGGG	GGTGTCTTGT	9900
GATGATGCAT	CTAAAAGCGG	TGACGCGGGC	GAGCCCCCGG	AGGTAGGGGG	9950
GGCTCCGGAC	CCGCCGGGAG	AGGGGGCAGG	GGCACGTCCG	CGCCGCGCGC	10000
GGGCAGGAGC	TGGTGCTGCG	CGCGTAGGTT	GCTGGCGAAC	GCGACGACGC	10050
GGCGGTTGAT	CTCCTGAATC	TGGCGCCTCT	GCGTGAAGAC	GACGGGCCCCG	10100
GTGAGCTTGA	GCCTGAAAGA	GAGTTCGACA	GAATCAATTT	CGGTGTCGTT	10150
GACGGCGGCC	TGGCGCAAAA	TCTCCTGCAC	GTCTCCTGAG	TTGTCTTGAT	10200
AGGCGATCTC	GGCCATGAAC	TGCTCGATCT	CTTCCTCCTG	GAGATCTCCG	10250
CGTCCGGGTC	GCTCCACGGT	GGCGGCGAGG	TCGTTGGAAA	TGCGGGCCAT	10300
GAGCTGCGAG	AAGGCGTTGA	GGCCTCCCTC	GTTCCAGACG	CGGCTGTAGA	10350
CCACGCCCCC	TTCGGCATCG	CGGGCGCGCA	TGACCACCTG	CGCGAGATTG	10400
AGCTCCACGT	GCCGGGCGAA	GACGGCGTAG	TTTCGCAGGC	GCTGAAAGAG	10450
GTAGTTGAGG	GTGGTGGCGG	TGTGTTCTGC	CACGAAGAAG	TACATAACCC	10500
AGCGTCGCAA	CGTGGATTCT	TTGATATCCC	CCAAGGCCTC	AAGGCGCTCC	10550
ATGGCCTCGT	AGAAGTCCAC	GGCGAAGTTG	AAAAACTGGG	AGTTGCGCGC	10600
CGACACGGTT	AACTCCTCCT	CCAGAAGACG	GATGAGCTCG	GCGACAGTGT	10650
CGCGCACCTC	GCGCTCAAAG	GCTACAGGGG	CCTCTTCTTC	TTCTTCAATC	10700

TCCTCTTCCA	TAAGGGCCTC	CCCTTCTTCT	TCTTCTGGCG	GCGGTGGGGG	10750
AGGGGGGACA	CGGCGGCGAC	GACGGCGCAC	CGGGAGGCGG	TCGACAAAGC	10800
GCTCGATCAT	CTCCCCGCGG	CGACGGCGCA	TGGTCTCGGT	GACGGCGCGG	10850
CCGTTCTCGC	GGGGGCGCAG	TTGGAAGACG	CCGCCCGTCA	TGTCCCGGTT	10900
ATGGSTTGGC	GGGGGGCTGC	CATGCGGCAG	GGATACGGCG	CTAACGATGC	10950
ATCTCAACAA	TTGTTGTGTA	GGTACTCCGC	CGCCGAGGGA	CCTGAGCGAG	11000
TCCGCATCGA	CCGGATCGGA	AAACCTCTCG	AGAAAGGCGT	CTAACCAGTC	11050
ACAGTCGCAA	GGTAGGCTGA	GCACCGTGGC	GGGCGGCAGC	GGGCGGCGGT	11100
CGGGGTTGTT	TCTGGCGGAG	GTGCTGCTGA	TGATGTAATT	AAAGTAGGCG	11150
GTCTTGAGAC	GGCGGATGGT	CGACAGAAGC	ACCATGTCCT	TGGGTCCGGC	11200
CTGCTGAATG	CGCAGGCGGT	CGGCCATGCC	CCAGGCTTCG	TTTGACATC	11250
GGCGCAGGTC	TTTGTAGTAG	TCTTGCATGA	GCCTTTCTAC	CGGCACTTCT	11300
TCTTCTCCTT	CCTCTTGTC	TGCATCTCTT	GCATCTATCG	CTGCGGCGGC	11350
GGCGGAGTTT	GGCCGTAGGT	GGCGCCCTCT	TCCTCCCATG	CGTGTGACCC	11400
CGAAGCCCCCT	CATCGGCTGA	AGCAGGGCTA	GGTCGGCGAC	AACGCGCTCG	11450
GCTAATATGG	CCTGCTGCAC	CTGCGTGAGG	GTAGACTGGA	AGTCATCCAT	11500
GTCCACAAAG	CGGTGGTATG	CGCCCGTGTT	GATGGTGTA	GTGCAGTTGG	11550
CCATAACGGA	CCAGTTAACG	GTCTGGTGAC	CCGGCTGCGA	GAGCTCGGTG	11600
TACCTGAGAC	CGGAGTAAGC	CCTCGAGTCA	AATACGTAGT	CGTTGCAAGT	11650
CCGCACCAGG	TACTGGTATC	CCACCAAAAA	GTGCGGCGGC	GGCTGGCGGT	11700
AGAGGGGGCCA	GCGTAGGGTG	GCCGGGGCTC	CGGGGGCGAG	ATCTTCCAAC	11750
ATAAGGCGAT	GATATCCGTA	GATGTACCTG	GACATCCAGG	TGATGCCGGC	11800
GGCGGTGGTG	GAGGCGCGCG	GAAAGTCGCG	GACGCGGTTC	CAGATGTTGC	11850
GCAGCGGCAA	AAAGTGCTCC	ATGGTCGGGA	CGCTCTGGCC	GGTCAGGCGC	11900
GCGCAATCGT	TGACGCTCTA	GACCGTGCAA	AAGGAGAGCC	TGTAAGCGGG	11950
CACTCTTCCG	TGGTCTGGTG	GATAAATTCG	CAAGGGTATC	ATGGCGGACG	12000

ACCGGGGTTTC	GAGCCCCGTA	TCCGGCCGTC	CGCCGTGATC	CATGCGGTTA	12050
CCGCCCCGCGT	GTCGAACCCA	GGTGTGCGAC	GTCAGACAAC	GGGGGAGTGC	12100
TCCTTTTGGC	TTCCCTCCAG	GCGCGGCGGC	TGCTGCGCTA	GCTTTTTTGG	12150
CCACTGGCCG	CGCGCAGCGT	AAGCGGTTAG	GCTGGAAAGC	GAAAGCATTA	12200
AGTGGCTCGC	TCCCTGTAGC	CGGAGGGTTA	TTTTCCAAGG	GTTGAGTCGC	12250
GGGACCCCCG	GTTCGAGTCT	CGGACCGGCC	GGACTGCGGC	GAACGGGGGT	12300
TTGCCTCCCC	GTCATGCAAG	ACCCCGCTTG	CAAATTCCTC	CGGAAACAGG	12350
GACGAGCCCC	TTTTTTGCTT	TTCCCAGATG	CATCCGGTGC	TGCGGCAGAT	12400
GCGCCCCCCT	CCTCAGCAGC	GGCAAGAGCA	AGAGCAGCGG	CAGACATGCA	12450
GGGCACCCTC	CCCTCCTCCT	ACCGCGTCAG	GAGGGGCGAC	ATCCGCGGTT	12500
GACGCGGCAG	CAGATGGTGA	TTACGAACCC	CCGCGGCGCC	GGGCCCCGCA	12550
CTACCTGGAC	TTGGAGGAGG	GCGAGGGCCT	GGCGCGGCTA	GGAGCGCCCT	12600
CTCCTGAGCG	GTACCCAAGG	GTGCAGCTGA	AGCGTGATAC	GCGTGAGGCG	12650
TACGTGCCGC	GGCAGAACCT	GTTTCGCGAC	CGCGAGGGAG	AGGAGCCCCGA	12700
GGAGATGCGG	GATCGAAAGT	TCCACGCAGG	GCGCGAGCTG	CGGCATGGCC	12750
TGAATCGCGA	GCGGTTGCTG	CGCGAGGAGG	ACTTTGAGCC	CGACGCGCGA	12800
ACCGGGATTA	GTCCCGCGCG	CGCACACGTG	GCGGCCGCCG	ACCTGGTAAC	12850
CGCATACGAG	CAGACGGTGA	ACCAGGAGAT	TAACTTTCAA	AAAAGCTTTA	12900
ACAACCACGT	GCGTACGCTT	GTGGCGCGCG	AGGAGGTGGC	TATAGGACTG	12950
ATGCATCTGT	GGGACTTTGT	AAGCGCGCTG	GAGCAAAACC	CAAATAGCAA	13000
GCCGCTCATG	GCGCAGCTGT	TCCTTATAGT	GCAGCACAGC	AGGGACAACG	13050
AGGCATTTCAG	GGATGCGCTG	CTAAACATAG	TAGAGCCCGA	GGGCCGCTGG	13100
CTGCTCGATT	TGATAAACAT	CCTGCAGAGC	ATAGTGGTGC	AGGAGCGCAG	13150
CTTGAGCCTG	GCTGACAAGG	TGGCCGCCAT	CAACTATTCC	ATGCTTAGCC	13200
TGGGCAAGTT	TTACGCCCGC	AAGATATACC	ATACCCCTTA	CGTTCCCATA	13250
GACAAGGAGG	TAAAGATCGA	GGGGTTCTAC	ATGCGCATGG	CGCTGAAGGT	13300

GCTTACCTTG	AGCGACGACC	TGGGCGTTTA	TCGCAACGAG	CGCATCCACA	13350
AGGCCGTGAG	CGTGAGCCGG	CGGCGCGAGC	TCAGCGACCG	CGAGCTGATG	13400
CACAGCCTGC	AAAGGGCCCT	GGCTGGCACC	GGCAGCGGCG	ATAGAGAGGC	13450
CGAGTCCTAC	TTTGACGCGG	GCGCTGACCT	GCGCTGGGCC	CCAAGCCGAC	13500
GCGCCCTGGA	GGCAGCTGGG	GCCGGACCTG	GGCTGGCGGT	GGCACCCGCG	13550
CGCGCTGGCA	ACGTCGGCGG	CGTGAGAGAA	TATGACGAGG	ACGATGAGTA	13600
CGAGCCAGAG	GACGGCGAGT	ACTAAGCGGT	GATGTTTCTG	ATCAGATGAT	13650
GCAAGACGCA	ACGGACCCGG	CGGTGCGGGC	GGCGCTGCAG	AGCCAGCCGT	13700
CCGGCCTTAA	CTCCACGGAC	GACTGGCGCC	AGGTCATGGA	CCGCATCATG	13750
TCGCTGACTG	CGCGCAATCC	TGACGCGTTC	CGGCAGCAGC	CGCAGGCCAA	13800
CCGGCTCTCC	GCAATTCTGG	AAGCGGTGGT	CCCGGCGCGC	GCAAACCCCA	13850
CGCACGAGAA	GGTGCTGGCG	ATCGTAAACG	CGCTGGCCGA	AAACAGGGCC	13900
ATCCGGCCCCG	ACGAGGCCGG	CCTGGTCTAC	GACGCGCTGC	TTCAGCGCGT	13950
GGCTCGTTAC	AACAGCGGCA	ACGTGCAGAC	CAACCTGGAC	CGGCTGGTGG	14000
GGGATGTGCG	CGAGGCCGTG	GCGCAGCGTG	AGCGCGCGCA	GCAGCAGGGC	14050
AACCTGGGCT	CCATGGTTGC	ACTAAACGCC	TTCCTGAGTA	CACAGCCCGC	14100
CAACGTGCCG	CGGGGACAGG	AGGACTACAC	CAACTTTGTG	AGCGCACTGC	14150
GGCTAATGGT	GACTGAGACA	CCGCAAAGTG	AGGTGTACCA	GTCTGGGCCA	14200
GACTATTTTT	TCCAGACCAG	TAGACAAGGC	CTGCAGACCG	TAAACCTGAG	14250
CCAGGCTTTC	AAAAACTTGC	AGGGGCTGTG	GGGGGTGCGG	GCTCCACAG	14300
GCGACCGCGC	GACCGTGTCT	AGCTTGCTGA	CGCCCAACTC	GCGCCTGTTG	14350
CTGCTGCTAA	TAGCGCCCTT	CACGGACAGT	GGCAGCGTGT	CCCGGGACAC	14400
ATACCTAGGT	CACTTGCTGA	CACTGTACCG	CGAGGCCATA	GGTCAGGCGC	14450
ATGTGGACGA	GCATACTTTC	CAGGAGATTA	CAAGTGTCAG	CCGCGCGCTG	14500
GGGCAGGAGG	ACACGGGCAG	CCTGGAGGCA	ACCCTAAACT	ACCTGCTGAC	14550
CAACCGGCGG	CAGAAGATCC	CCTCGTTGCA	CAGTTTAAAC	AGCGAGGAGG	14600

AGCGCATTTT	GCGCTACGTG	CAGCAGAGCG	TGAGCCTTAA	CCTGATGCGC	14650
GACGGGGTAA	CGCCCAGCGT	GGCGCTGGAC	ATGACCGCGC	GCAACATGGA	14700
ACCGGGCATG	TATGCCTCAA	ACCGGCCGTT	TATCAACCGC	CTAATGGACT	14750
ACTTGCATCG	CGCGGCCGCC	GTGAACCCCG	AGTATTTTAC	CAATGCCATC	14800
TTGAACCCGC	ACTGGCTACC	GCCCCCTGGT	TTCTACACCG	GGGGATTCTGA	14850
GGTGCCCGAG	GGTAACGATG	GATTCCTCTG	GGACGACATA	GACGACAGCG	14900
TGTTTTCCCC	GCAACCGCAG	ACCCTGCTAG	AGTTGCAACA	GCGCGAGCAG	14950
GCAGAGGCGG	CGCTGCGAAA	GGAAAGCTTC	CGCAGGCCAA	GCAGCTTGTC	15000
CGATCTAGGC	GCTGCGGCC	CGCGGTCAGA	TGCTAGTAGC	CCATTTCCAA	15050
GCTTGATAGG	GTCTCTTACC	AGCACTCGCA	CCACCCGCCC	GCGCCTGCTG	15100
GGCGAGGAGG	AGTACCTAAA	CAACTCGCTG	CTGCAGCCGC	AGCGCGAAAA	15150
AAACCTGCCT	CCGGCATTTT	CCAACAACGG	GATAGAGAGC	CTAGTGGACA	15200
AGATGAGTAG	ATGGAAGACG	TACGCGCAGG	AGCACAGGGA	CGTGCCAGGC	15250
CCGCGCCCGC	CCACCCGTCT	TCAAAGGCAC	GACCGTCAGC	GGGGTCTGGT	15300
GTGGGAGGAC	GATGACTCGG	CAGACGACAG	CAGCGTCCTG	GATTTGGGAG	15350
GGAGTGGCAA	CCCGTTTGCG	CACCTTCGCC	CCAGGCTGGG	GAGAATGTTT	15400
TAAAAAAAAA	AAAGCATGAT	GCAAAATAAA	AAACTCACCA	AGGCCATGGC	15450
ACCGAGCGTT	GGTTTTCTTG	TATTCCTCTT	AGTATGCGGC	GCGCGGCGAT	15500
GATGAGGAA	GGTCCTCCTC	CCTCCTACGA	GAGTGTGGTG	AGCGCGGCGC	15550
CAGTGGCGGC	GGCGCTGGGT	TCTCCCTTCG	ATGCTCCCTT	GGACCCGCCG	15600
TTTGTGCCTC	CGCGGTACCT	GCGGCCTACC	GGGGGGAGAA	ACAGCATCCG	15650
TTACTCTGAG	TTGGCACCCC	TATTCGACAC	CACCCGTGTG	TACCTGGTGG	15700
ACAACAAGTC	AACGGATGTG	GCATCCCTGA	ACTACCAGAA	CGACCACAGC	15750
AACTTTCTGA	CCACGGTCAT	TCAAAACAAT	GACTACAGCC	CGGGGGAGGC	15800
AAGCACACAG	ACCATCAATC	TTGACGACCG	GTCGCACTGG	GGCGGCGACC	15850
TGAAAACCAT	CCTGCATACC	AACATGCCAA	ATGTGAACGA	GTTTATGTTT	15900

ACCAATAAGT	TTAAGGCGCG	GGTGATGGTG	TCGCGCTTGC	CTACTAAGGA	15950
CAATCAGGTG	GAGCTGAAAT	ACGAGTGGGT	GGAGTTCACG	CTGCCCCGAGG	16000
GCAACTACTC	CGAGACCATG	ACCATAGACC	TTATGAACAA	CGCGATCGTG	16050
GAGCACTACT	TGAAAGTGGG	CAGACAGAAC	GGGGTTCTGG	AAAGCGACAT	16100
CGGGGTAAAG	TTTGACACCC	GCAACTTCAG	ACTGGGGTTT	GACCCCGTCA	16150
CTGGTCTTGT	CATGCCTGGG	GTATATACAA	ACGAAGCCTT	CCATCCAGAC	16200
ATCATTTTGC	TGCCAGGATG	CGGGGTGGAC	TTCACCCACA	GCCGCCTGAG	16250
CAACTTGTTG	GGCATCCGCA	AGCGGCAACC	CTTCCAGGAG	GGCTTTAGGA	16300
TCACCTACGA	TGATCTGGAG	GGTGGTAACA	TTCCCGCACT	GTTGGATGTG	16350
GACGCCTACC	AGGCGAGCTT	GAAAGATGAC	ACCGAACAGG	GCGGGGGTGG	16400
CGCAGGCGGC	AGCAACAGCA	GTGGCAGCGG	CGCGGAAGAG	AACTCCAACG	16450
CGGCAGCCGC	GGCAATGCAG	CCGGTGGAGG	ACATGAACGA	TCATGCCATT	16500
CGCGGCGACA	CCTTTGCCAC	ACGGGCTGAG	GAGAAGCGCG	CTGAGGCCGA	16550
AGCAGCGGCC	GAAGCTGCCG	CCCCCGCTGC	GCAACCCGAG	GTCGAGAAGC	16600
CTCAGAAGAA	ACCGGTGATC	AAACCCCTGA	CAGAGGACAG	CAAGAAACGC	16650
AGTTACAACC	TAATAAGCAA	TGACAGCACC	TTCACCCAGT	ACCGCAGCTG	16700
GTACCTTGCA	TACAACTACG	GCGACCCTCA	GACCGGAATC	CGCTCATGGA	16750
CCCTGCTTTG	CACTCCTGAC	GTAACCTGCG	GCTCGGAGCA	GGTCTACTGG	16800
TCGTTGCCAG	ACATGATGCA	AGACCCCGTG	ACCTTCCGCT	CCACGCGCCA	16850
GATCAGCAAC	TTTCCGGTGG	TGGGCGCCGA	GCTGTTGCCC	GTGCACTCCA	16900
AGAGCTTCTA	CAACGACCAG	GCCGTCTACT	CCCAACTCAT	CCGCCAGTTT	16950
ACCTCTCTGA	CCCACGTGTT	CAATCGCTTT	CCCAGAACC	AGATTTTGGC	17000
GCGCCCGCCA	GCCCCACCA	TCACCACCGT	CAGTGAAAAC	GTCCTGCTC	17050
TCACAGATCA	CGGGACGCTA	CCGCTGCGCA	ACAGCATCGG	AGGAGTCCAG	17100
CGAGTGACCA	TTACTGACGC	CAGACGCCGC	ACCTGCCCT	ACGTTTACAA	17150
GGCCCTGGGC	ATAGTCTCGC	CGCGCGTCCT	ATCGAGCCGC	ACTTTTGTAG	17200

CAAGCATGTC	CATCCTTATA	TCGCCCAGCA	ATAACACAGG	CTGGGGCCTG	17250
CGCTTCCCAA	GCAAGATGTT	TGGCGGGGCC	AAGAAGCGCT	CCGACCAACA	17300
CCCAGTGCGC	GTGCGCGGGC	ACTACCGCGC	GCCCTGGGGC	GCGCACAAAC	17350
GCGGCCGCAC	TGGGCGCACC	ACCGTCGATG	ACGCCATCGA	CGCGGTGGTG	17400
GAGGAGGCGC	GCAACTACAC	GCCCACGCCG	CCACCAGTGT	CCACAGTGGA	17450
CGCGGCCATT	CAGACCGTGG	TGCGCGGAGC	CCGGCGCTAT	GCTAAAATGA	17500
AGAGACGGCG	GAGGCGCGTA	GCACGTCGCC	ACCGCCGCCG	ACCCGGCACT	17550
GCCGCCCAAC	GCGCGGCGGC	GGCCCTGCTT	AACCGCGCAC	GTCGCACCGG	17600
CCGACGGGCG	GCCATGCGGG	CCGCTCGAAG	GCTGGCCGCG	GGTATTGTCA	17650
CTGTGCCCCC	CAGGTCCAGG	CGACGAGCGG	CCGCCGCAGC	AGCCCGGGCC	17700
ATTAGTGCTA	TGACTCAGGG	TCGCAGGGGC	AACGTGTATT	GGGTGCGCGA	17750
CTCGGTTAGC	GGCCTGCGCG	TGCCCCGTGC	CACCCGCCCC	CCGCGCAACT	17800
AGATTGCAAG	AAAAAACTAC	TTAGACTCGT	ACTGTTGTAT	GTATCCAGCG	17850
GCGGCGGCGC	GCAACGAAGC	TATGTCCAAG	CGCAAAATCA	AAGAAGAGAT	17900
GCTCCAGGTC	ATCGCGCCGG	AGATCTATGG	CCCCCGAAG	AAGGAAGAGC	17950
AGGATTACAA	GCCCCGAAAG	CTAAAGCGGG	TCAAAAAGAA	AAAGAAAGAT	18000
GATGATGATG	AACTTGACGA	CGAGGTGGAA	CTGCTGCACG	CTACCGCGCC	18050
CAGGCGACGG	GTACAGTGGA	AAGGTGACG	CGTAAAACGT	GTTTTGCGAC	18100
CCGGCACCAAC	CGTAGTCTTT	ACGCCCCGGT	AGCGCTCCAC	CCGCACCTAC	18150
AAGCGCGTGT	ATGATGAGGT	GTACGGCGAC	GAGGACCTGC	TTGAGCAGGC	18200
CAACGAGCGC	CTCGGGGAGT	TTGCCTACGG	AAAGCGGCAT	AAGGACATGC	18250
TGGCGTTGCC	GCTGGACGAG	GGCAACCCAA	CACCTAGCCT	AAAGCCCGTA	18300
ACACTGCAGC	AGGTGCTGCC	CGCGCTTGCA	CCGTCCGAAG	AAAAGCGCGG	18350
CCTAAAGCGC	GAGTCTGGTG	ACTTGGCACC	CACCGTGCAG	CTGATGGTAC	18400
CCAAGCGCCA	GCGACTGGAA	GATGTCTTGG	AAAAAATGAC	CGTGGAACCT	18450
GGGCTGGAGC	CCGAGGTCCG	CGTGCGGCCA	ATCAAGCAGG	TGGCGCCGGG	18500

ACTGGGCGTG	CAGACCGTGG	ACGTTTCAGAT	ACCCACTACC	AGTAGCACCA	18550
GTATTGCCAC	CGCCACAGAG	GGCATGGAGA	CACAAACGTC	CCCGGTTGCC	18600
TCAGCGGTGG	CGGATGCCGC	GGTGCAGGCG	GTCGCTGCGG	CCGCGTCCAA	18650
GACCTCTACG	GAGGTGCAAA	CGGACCCGTG	GATGTTTCGC	GTTTCAGCCC	18700
CCCGGCGCCC	GCGCGGTTCG	AGGAAGTACG	GCGCCGCCAG	CGCGCTACTG	18750
CCCGAATATG	CCCTACATCC	TTCCATTGCG	CCTACCCCCG	GCTATCGTGG	18800
CTACACCTAC	CGCCCCAGAA	GACGAGCAAC	TACCCGACGC	CGAACCACCA	18850
CTGGAACCCG	CCGCCGCCGT	CGCCGTCGCC	AGCCCGTGCT	GGCCCCGATT	18900
TCCGTGCGCA	GGGTGGCTCG	CGAAGGAGGC	AGGACCCTGG	TGCTGCCAAC	18950
AGCGCGCTAC	CACCCCAGCA	TCGTTTAAAA	GCCGGTCTTT	GTGGTTCTTG	19000
CAGATATGGC	CCTCACCTGC	CGCCTCCGTT	TCCCGGTGCC	GGGATTCCGA	19050
GGAAGAATGC	ACCGTAGGAG	GGGCATGGCC	GGCCACGGCC	TGACGGGCGG	19100
CATGCGTCGT	GCGCACCACC	GGCGGCGGCG	CGCGTCGCAC	CGTCGCATGC	19150
GCGGCGGTAT	CCTGCCCCCTC	CTTATTCCAC	TGATCGCCGC	GGCGATTGGC	19200
GCCGTGCCCC	GAATTGCATC	CGTGGCCTTG	CAGGCGCAGA	GACACTGATT	19250
AAAAACAAGT	TGCATGTGGA	AAAATCAAAA	TAAAAAGTCT	GGACTCTCAC	19300
GCTCGCTTGG	TCCTGTA ACT	ATTTTGTAGA	ATGGAAGACA	TCAACTTTGC	19350
GTCTCTGGCC	CCGCGACACG	GCTCGCGCCC	GTTTCATGGGA	AACTGGCAAG	19400
ATATCGGCAC	CAGCAATATG	AGCGGTGGCG	CCTTCAGCTG	GGGCTCGCTG	19450
TGGAGCGGCA	TTAAAAATTT	CGGTTCCACC	GTTAAGAACT	ATGGCAGCAA	19500
GGCCTGGAAC	AGCAGCACAG	GCCAGATGCT	GAGGGATAAG	TTGAAAGAGC	19550
AAAATTTCCA	ACAAAAGGTG	GTAGATGGCC	TGGCCTCTGG	CATTAGCGGG	19600
GTGGTGGACC	TGGCCAACCA	GGCAGTGCAA	AATAAGATTA	ACAGTAAGCT	19650
TGATCCCCGC	CCTCCCCGTAG	AGGAGCCTCC	ACCGGCCCGTG	GAGACAGTGT	19700
CTCCAGAGGG	GCGTGGCGAA	AAGCGTCCGC	GCCCCGACAG	GGAAGAACT	19750
CTGGTGACGC	AAATAGACGA	GCCTCCCTCG	TACGAGGAGG,	CACTAAAGCA	19800

AGGCCTGCCC	ACCACCCGTC	CCATCGCGCC	CATGGCTACC	GGAGTGCTGG	19850
GCCAGCACAC	ACCCGTAACG	CTGGACCTGC	CTCCCCCCGC	CGACACCCAG	19900
CAGAAACCTG	TGCTGCCAGG	CCCGACCGCC	GTTGTTGTAA	CCCGTCCTAG	19950
CCGCGCGTCC	CTGCGCCGCG	CCGCCAGCGG	TCCGCGATCG	TTGCGGCCCCG	20000
TAGCCAGTGG	CAACTGGCAA	AGCACACTGA	ACAGCATCGT	GGGTCTGGGG	20050
GTGCAATCCC	TGAAGCGCCG	ACGATGCTTC	TGAATAGCTA	ACGTGTCGTA	20100
TGTGTGTCAT	GTATGCGTCC	ATGTCGCCCC	CAGAGGAGCT	GCTGAGCCGC	20150
CGCGCGCCCC	CTTTCCAAGA	TGGCTACCCC	TTCGATGATG	CCGCAGTGGT	20200
CTTACATGCA	CATCTCGGGC	CAGGACGCCT	CGGAGTACCT	GAGCCCCGGG	20250
CTGGTGCACT	TTGCCCCGCG	CACCGAGACG	TACTTCAGCC	TGAATAACAA	20300
GTTTAGAAAC	CCCACGGTGG	CGCCTACGCA	CGACGTGACC	ACAGACCGGT	20350
CCCAGCGTTT	GACGCTGCGG	TTCATCCCTG	TGGACCGTGA	GGATACTGCG	20400
TACTCGTACA	AGGCGCGGTT	CACCCTAGCT	GTGGGTGATA	ACCGTGTGCT	20450
GGACATGGCT	TCCACGTACT	TTGACATCCG	CGGCGTGCTG	GACAGGGGCC	20500
CTACTTTTAA	GCCCTACTCT	GGCACTGCCT	ACAACGCCCT	GGCTCCCAAG	20550
GGTGCCCCAA	ATCCTTGCGA	ATGGGATGAA	GCTGCTACTG	CTCTTGAAAT	20600
AAACCTAGAA	GAAGAGGACG	ATGACAACGA	AGACGAAGTA	GACGAGCAAG	20650
CTGAGCAGCA	AAAACTCAC	GTATTTGGGC	AGGCGCCTTA	TTCTGGTATA	20700
AATATTACAA	AGGAGGGTAT	TCAAATAGGT	GTCGAAGGTC	AAACACCTAA	20750
ATATGCCGAT	AAAACATTTT	AACCTGAACC	TCAAATAGGA	GAATCTCAGT	20800
GGTACGAAAC	TGAAATTAAT	CATGCAGCTG	GGAGAGTCCT	TAAAAAGACT	20850
ACCCCAATGA	AACCATGTTA	CGGTTTCATAT	GCAAAACCCA	CAAATGAAAA	20900
TGGAGGGCAA	GGCATTCTTG	TAAAGCAACA	AAATGGAAAG	CTAGAAAGTC	20950
AAGTGGAAT	GCAATTTTTC	TCAACTACTG	AGGCGACCGC	AGGCAATGGT	21000
GATAACTTGA	CTCCTAAAGT	GGTATTGTAC	AGTGAAGATG	TAGATATAGA	21050
AACCCAGAC	ACTCATATTT	CTTACATGCC	CACTATTAAG	GAAGGTAACT	21100

CACGAGAACT	AATGGGCCAA	CAATCTATGC	CCAACAGGCC	TAATTACATT	21150
GCTTTTAGGG	ACAATTTTAT	TGGTCTAATG	TATTACAACA	GCACGGGTAA	21200
TATGGGTGTT	CTGGCGGGCC	AAGCATCGCA	GTTGAATGCT	GTGTAGATT	21250
TGCAAGACAG	AAACACAGAG	CTTTCATACC	AGCTTTTGCT	TGATTCCATT	21300
GGTGATAGAA	CCAGGTACTT	TTCTATGTGG	AATCAGGCTG	TTGACAGCTA	21350
TGATCCAGAT	GTTAGAATTA	TTGAAAATCA	TGGAAGTAA	GATGAAGTTC	21400
CAAATTACTG	CTTTCCACTG	GGAGGTGTGA	TTAATACAGA	GACTCTTACC	21450
AAGGTAAAC	CTAAACAGG	TCAGGAAAAT	GGATGGGAAA	AAGATGCTAC	21500
AGAATTTTCA	GATAAAAATG	AAATAAGAGT	TGGAAATAAT	TTTGCCATGG	21550
AAATCAATCT	AAATGCCAAC	CTGTGGAGAA	ATTCCTGTGA	CTCCAACATA	21600
GCGCTGTATT	TGCCCCGACAA	GCTAAAGTAC	AGTCCTTCCA	ACGTAAAAAT	21650
TTCTGATAAC	CCAAACACCT	ACGACTACAT	GAACAAGCGA	GTGGTGGCTC	21700
CCGGGTAGT	GGACTGCTAC	ATTAACCTTG	GAGCACGCTG	GTCCCTTGAC	21750
TATATGGACA	ACGTCAACCC	ATTTAACCAC	CACCGCAATG	CTGGCCTGCG	21800
CTACCGCTCA	ATGTTGCTGG	GCAATGGTCG	CTATGTGCCC	TTCCACATCC	21850
AGGTGCCTCA	GAAGTTCTTT	GCCATTAAAA	ACCTCCTTCT	CCTGCCGGGC	21900
TCATACACCT	ACGAGTGGA	CTTCAGGAAG	GATGTTAACA	TGGTTCTGCA	21950
GAGCTCCCTA	GGAAATGACC	TAAGGGTTGA	CGGAGCCAGC	ATTAAGTTTG	22000
ATAGCATTTG	CCTTTACGCC	ACCTTCTTCC	CCATGGCCCCA	CAACACCGCC	22050
TCCACGCTTG	AGGCCATGCT	TAGAAACGAC	ACCAACGACC	AGTCCTTTAA	22100
CGACTATCTC	TCCGCCGCCA	ACATGCTCTA	CCCTATACCC	GCCAACGCTA	22150
CCAACGTGCC	CATATCCATC	CCCTCCCGCA	ACTGGGCGGC	TTCCGCGGC	22200
TGGGCCTTCA	CGCGCCTTAA	GACTAAGGAA	ACCCCATCAC	TGGGCTCGGG	22250
CTACGACCCT	TATTACACCT	ACTCTGGCTC	TATACCCTAC	CTAGATGGAA	22300
CCTTTTACCT	CAACCACACC	TTAAGAAGG	TGGCCATTAC	CTTGACTCT	22350
TCTGTCAGCT	GGCCTGGCAA	TGACCGCCTG	CTTACCCCCA	ACGAGTTTGA	22400

AATTAAGCGC	TCAGTTGACG	GGGAGGGTTA	CAACGTTGCC	CAGTGTAACA	22450
TGACCAAAGA	CTGGTTCCTG	GTACAAATGC	TAGCTAACTA	CAACATTGGC	22500
TACCAGGGCT	TCTATATCCC	AGAGAGCTAC	AAGGACCGCA	TGTACTCCTT	22550
CTTTAGAAAC	TTCCAGCCCA	TGAGCCGTCA	GGTGGTGGAT	GATACTAAAT	22600
ACAAGGACTA	CCAACAGGTG	GGCATCCTAC	ACCAACACAA	CAACTCTGGA	22650
TTTGTTGGCT	ACCTTGCCCC	CACCATGCGC	GAAGGACAGG	CCTACCCTGC	22700
TAACTTCCCC	TATCCGCTTA	TAGGCAAGAC	CGCAGTTGAC	AGCATTACCC	22750
AGAAAAAGTT	TCTTTGCGAT	CGCACCCCTT	GGCGCATCCC	ATTCTCCAGT	22800
AACTTTATGT	CCATGGGCGC	ACTCACAGAC	CTGGGCCAAA	ACCTTCTCTA	22850
CGCCAACTCC	GCCCACGCGC	TAGACATGAC	TTTTGAGGTG	GATCCCATGG	22900
ACGAGCCCAC	CCTTCTTTAT	GTTTTGTTTG	AAGTCTTTGA	CGTGGTCCGT	22950
GTGCACCGGC	CGCACCGCGG	CGTCATCGAA	ACCGTGTAAC	TGCGCACGCC	23000
CTTCTCGGCC	GGCAACGCCA	CAACATAAAG	AAGCAAGCAA	CATCAACAAC	23050
AGCTGCCGCC	ATGGGCTCCA	GTGAGCAGGA	ACTGAAAGCC	ATTGTCAAAG	23100
ATCTTGTTTG	TGGGCCATAT	TTTTTGGGCA	CCTATGACAA	GCGCTTTCCA	23150
GGCTTTGTTT	CTCCACACAA	GCTCGCCTGC	GCCATAGTCA	ATACGGCCGG	23200
TCGCGAGACT	GGGGGCGTAC	ACTGGATGGC	CTTTGCCTGG	AACCCGCACT	23250
CAAAAACATG	CTACCTCTTT	GAGCCCTTTG	GCTTTTCTGA	CCAGCGACTC	23300
AAGCAGGTTT	ACCAGTTTGA	GTACGAGTCA	CTCCTGCGCC	GTAGCGCCAT	23350
TGCTTCTTCC	CCCGACCGCT	GTATAACGCT	GGAAAAGTCC	ACCCAAAGCG	23400
TACAGGGGCC	CAACTCGGCC	GCCTGTGGAC	TATTCTGCTG	CATGTTTCTC	23450
CACGCCTTTG	CCAACTGGCC	CCAAACTCCC	ATGGATCACA	ACCCACCAT	23500
GAACCTTATT	ACCGGGGTAC	CCAACTCCAT	GCTCAACAGT	CCCCAGGTAC	23550
AGCCCACCCT	GCGTCGCAAC	CAGGAACAGC	TCTACAGCTT	CCTGGAGCGC	23600
CACTCGCCCT	ACTTCCGCAG	CCACAGTGCG	CAGATTAGGA	GCGCCACTTC	23650
TTTTTGTCAC	TTGAAAACA	TGTAAAATA	ATGTACTAGA	GACACTTTCA	23700

ATAAAGGCAA	ATGCTTTTAT	TTGTACACTC	TCGGGTGATT	ATTTACCCCC	23750
ACCCTTGCCG	TCTGCGCCGT	TTAAAAATCA	AAGGGGTTCT	GCCGCGCATC	23800
GCTATGCGCC	ACTGGCAGGG	ACACGTTGCG	ATACTGGTGT	TTAGTGCTCC	23850
ACTTAAACTC	AGGCACAACC	ATCCGCGGCA	GCTCGGTGAA	GTTTTCACTC	23900
CACAGGCTGC	GCACCATCAC	CAACGCGTTT	AGCAGGTCGG	GCGCCGATAT	23950
CTTGAAAGTCG	CAGTTGGGGC	CTCCGCCCTG	CGCGCGCGAG	TTGCGATACA	24000
CAGGGTTGCA	GCACTGGAAC	ACTATCAGCG	CCGGGTGGTG	CACGCTGGCC	24050
AGCACGCTCT	TGTCGGAGAT	CAGATCCGCG	TCCAGGTCCT	CCGCGTTGCT	24100
CAGGGCGAAC	GGAGTCAACT	TTGGTAGCTG	CCTTCCCAAA	AAGGGCGCGT	24150
GCCCAGGCTT	TGAGTTGCAC	TCGCACCGTA	GTGGCATCAA	AAGGTGACCG	24200
TGCCCCGTCT	GGGCGTTAGG	ATACAGCGCC	TGCATAAAAG	CCTTGATCTG	24250
CTTAAAAGCC	ACCTGAGCCT	TTGCGCCTTC	AGAGAAGAAC	ATGCCGCAAG	24300
ACTTGCCGGA	AAACTGATTG	GCCGGACAGG	CCGCGTCGTG	CACGCAGCAC	24350
CTTGCGTCGG	TGTTGGAGAT	CTGCACCACA	TTTCGGCCCC	ACCGGTTCTT	24400
CACGATCTTG	GCCTTGCTAG	AETGCTCCTT	CAGCGCGCGC	TGCCCGTTTT	24450
CGCTCGTCAC	ATCCATTTCA	ATCACGTGCT	CCTTATTTAT	CATAATGCTT	24500
CCGTGTAGAC	ACTTAAGCTC	GCCTTCGATC	TCAGCGCAGC	GGTGCAGCCA	24550
CAACGCGCAG	CCCGTGGGCT	CGTGATGCTT	GTAGGTCACC	TCTGCAAACG	24600
ACTGCAGGTA	CGCCTGCAGG	AATCGCCCCA	TCATCGTCAC	AAAGGTCTTG	24650
TTGCTGGTGA	AGGTCAGCTG	CAACCCGCGG	TGCTCCTCGT	TCAGCCAGGT	24700
CTTGCATACG	GCCGCCAGAG	CTTCCACTTG	GTCAGGCAGT	AGTTTGAAGT	24750
TCGCCTTTAG	ATCGTTATCC	ACGTGGTACT	TGTCCATCAG	CGCGCGCGCA	24800
GCCTCCATGC	CCTTCTCCCA	CGCAGACACG	ATCGGCACAC	TCAGCGGGTT	24850
CATCACCGTA	ATTTCACTTT	CCGCTTCGCT	GGGCTCTTCC	TCTTCCTCTT	24900
GCGTCCGCAT	ACCACGCGCC	ACTGGGTCGT	CTTCATTCAG	CCGCCGCACT	24950
GTGCGCTTAC	CTCCTTTGCC	ATGCTTGATT	AGCACCGGTG	GGTTGCTGAA	25000

ACCCACCATT	TGTAGCGCCA	CATCTTCTCT	TTCTTCCTCG	CTGTCCACGA	25050
TTACCTCTGG	TGATGGCGGG	CGCTCGGGCT	TGGGAGAAGG	GCGCTTCTTT	25100
TTCTTCTTGG	GCGCAATGGC	CAAATCCGCC	GCCGAGGTCG	ATGGCCGCGG	25150
GCTGGGTGTG	CGCGGCACCA	GCGCGTCTTG	TGATGAGTCT	TCCTCGTCCT	25200
CGGACTCGAT	ACGCCGCCTC	ATCCGCTTTT	TTGGGGGCGC	CCGGGGAGGC	25250
GGCGGCGACG	GGGACGGGGA	CGACACGTCC	TCCATGGTTG	GGGGACGTCG	25300
CGCCGCACCG	CGTCCGCGCT	CGGGGGTGGT	TTCGCGCTGC	TCCTCTTCCC	25350
GACTGGCCAT	TTCTTCTCTC	TATAGGCAGA	AAAAGATCAT	GGAGTCAGTC	25400
GAGAAGAAGG	ACAGCCTAAC	CGCCCCCTCT	GAGTTCGCCA	CCACCGCCTC	25450
CACCGATGCC	GCCAACGCGC	CTACCACCTT	CCCCGTCGAG	GCACCCCCGC	25500
TTGAGGAGGA	GGAAGTGATT	ATCGAGCAGG	ACCCAGGTTT	TGTAAGCGAA	25550
GACGACGAGG	ACCGCTCAGT	ACCAACAGAG	GATAAAAAGC	AAGACCAGGA	25600
CAACGCAGAG	GCAAACGAGG	AACAAGTCGG	GCGGGGGGAC	GAAAGGCATG	25650
GCGACTACCT	AGATGTGGGA	GACGACGTGC	TGTTGAAGCA	TCTGCAGCGC	25700
CAGTGCGCCA	TTATCTGCGA	CGCTTGCAA	GAGCGCAGCG	ATGTGCCCCT	25750
CGCCATAGCG	GATGTCAGCC	TTGCCTACGA	ACGCCACCTA	TTCTCACCGC	25800
GCGTACCCCC	CAAACGCCAA	GAAAACGGCA	CATGCGAGCC	CAACCCGCGC	25850
CTCAACTTCT	ACCCCGTATT	TGCCGTGCCA	GAGGTGCTTG	CCACCTATCA	25900
CATCTTTTTC	CAAACTGCA	AGATACCCCT	ATCCTGCCGT	GCCAACCGCA	25950
GCCGAGCGGA	CAAGCAGCTG	GCCTTGCGGC	AGGGCGCTGT	CATACCTGAT	26000
ATCGCCTCGC	TCAACGAAGT	GCCAAAAATC	TTTGAGGGTC	TTGGACGCGA	26050
CGAGAAGCGC	GCGGCAAACG	CTCTGCAACA	GGAAAACAGC	GAAAATGAAA	26100
GTCACTCTGG	AGTGTGGTG	GAACTCGAGG	GTGACAACGC	GCGCCTAGCC	26150
GTAATAAAAC	GCAGCATCGA	GGTCACCCAC	TTTGCCTACC	CGGCACTTAA	26200
CCTACCCCCC	AAGGTCATGA	GCACAGTCAT	GAGTGAGCTG	ATCGTGCGCC	26250
GTGCGCAGCC	CCTGGAGAGG	GATGCAAATT	TGCAAGAACA	AACAGAGGAG	26300

GGCCTACCCG	CAGTTGGCGA	CGAGCAGCTA	GCGCGCTGGC	TTCAAACGCG	26350
CGAGCCTGCC	GACTTGGAGG	AGCGACGCAA	ACTAATGATG	GCCGCAGTGC	26400
TCGTTACCGT	GGAGCTTGAG	TGCATGCAGC	GGTTCTTTGC	TGACCCGGAG	26450
ATGCAGCGCA	AGCTAGAGGA	AACATTGCAC	TACACCTTTC	GACAGGGCTA	26500
CGTACGCCAG	GCCTGCAAGA	TCTCCAACGT	GGAGCTCTGC	AACCTGGTCT	26550
CCTACCTTGG	AATTTTGAC	GAAAACCGCC	TTGGGCAAAA	CGTGCTTCAT	26600
TCCACGCTCA	AGGGCGAGGC	GCGCCGCGAC	TACGTCCGCG	ACTGCGTTTA	26650
CTTATTTCTA	TGCTACACCT	GGCAGACGGC	CATGGGCGTT	TGGCAGCAGT	26700
GCTTGAGAGGA	GTGCAACCTC	AAGGAGCTGC	AGAAACTGCT	AAAGCAAAAC	26750
TTGAAGGACC	TATGGACGGC	CTTCAACGAG	CGCTCCGTGG	CCGCGCACCT	26800
GGCGGACATC	ATTTTCCCCG	AACGCCTGCT	TAAAACCCTG	CAACAGGGTC	26850
TGCCAGACTT	CACCAGTCAA	AGCATGTTGC	AGAACTTTAG	GAACTTTATC	26900
CTAGAGCGCT	CAGGAATCTT	GCCCCGCCACC	TGCTGTGCAC	TTCCTAGCGA	26950
CTTTGTGCCC	ATTAAGTACC	GCGAATGCCC	TCCGCCGCTT	TGGGGCCACT	27000
GCTACCTTCT	GCAGCTAGCC	AACTACCTTG	CCTACCACTC	TGACATAATG	27050
GAAGACGTGA	GCGGTGACGG	TCTACTGGAG	TGTCACTGTC	GCTGCAACCT	27100
ATGCACCCCG	CACCGCTCCC	TGGTTTGCAA	TTGCGAGCTG	CTTAACGAAA	27150
GTCAAATTAT	CGGTACCTTT	GAGCTGCAGG	GTCCCTCGCC	TGACGAAAAG	27200
TCCGCGGCTC	CGGGGTTGAA	ACTCACTCCG	GGGCTGTGGA	CGTCGGCTTA	27250
CCTTCGCAAA	TTTGTACCTG	AGGACTACCA	CGCCCACGAG	ATTAGGTTCT	27300
ACGAAGACCA	ATCCCGCCCC	CCAAATGCGG	AGCTTACCGC	CTGCGTCATT	27350
ACCCAGGGCC	ACATTCTTGG	CCAATTGCAA	GCCATCAACA	AAGCCCGCCA	27400
AGAGTTTCTG	CTACGAAAGG	GACGGGGGGT	TTACTTGGAC	CCCCAGTCCG	27450
GCGAGGAGCT	CAACCCAATC	CCCCCGCCGC	CGCAGCCCTA	TCAGCAGCAG	27500
CCGCGGGCCC	TTGCTTCCCA	GGATGGCACC	CAAAAAGAAG	CTGCAGCTGC	27550
CGCCGCCACC	CACGGACGAG	GAGGAATACT	GGGACAGTCA	GGCAGAGGAG	27600

GTTTTGGACG	AGGAGGAGGA	GGACATGATG	GAAGACTGGG	AGAGCCTAGA	27650
CGAGGAAGCT	TCCGAGGTCT	AAGAGGTGTC	AGACGAAACA	CCGTCACCCT	27700
CGGTCGCATT	CCCCTCGCCG	GCGCCCCAGA	AATCGGCAAC	CGGTTCCAGC	27750
ATGGCTACAA	CCTCCGCTCC	TCAGGCGCCG	CCGGCACTGC	CCGTTGCGCG	27800
ACCCAACCGT	AGATGGGACA	CCACTGGAAC	CAGGGCCGGT	AAGTCCAAGC	27850
AGCCGCCGCC	GTTAGCCCAA	GAGCAACAAC	AGCGCCAAGG	CTACCGCTCA	27900
TGGCGCGGGC	ACAAGAACGC	CATAGTTGCT	TGCTTGCAAG	ACTGTGGGGG	27950
CAACATCTCC	TTCGCCCGCC	GCTTTCTTCT	CTACCATCAC	GGCGTGGCCT	28000
TCCCCCGTAA	CATCCTGCAT	TACTACCGTC	ATCTCTACAG	CCCATACTGC	28050
ACCGGCGGCA	GCGGCAGCGG	CAGCAACAGC	AGCGGCCACA	CAGAAGCAAA	28100
GGCGACCGGA	TAGCAAGACT	CTGACAAAGC	CCAAGAAATC	CACAGCGGCG	28150
GCAGCAGCAG	GAGGAGGAGC	GCTGCGTCTG	GCGCCCAACG	AACCCGTATC	28200
GACCCGCGAG	CTTAGAAACA	GGATTTTTC	CACCTCTGTAT	GCTATATTTT	28250
AACAGAGCAG	GGGCCAAGAA	CAAGAGCTGA	AAATAAAAAA	CAGGTCTCTG	28300
CGATCCCTCA	CCCGCAGCTG	CCTGTATCAC	AAAAGCGAAG	ATCAGCTTCG	28350
GCGCACGCTG	GAAGACGCGG	AGGCTCTCTT	CAGTAAATAC	TGCGCGCTGA	28400
CTCTTAAGGA	CTAGTTTCGC	GCCCTTTCTC	AAATTTAAGC	GCGAAACTA	28450
CGTCATCTCC	AGCGGCCACA	CCCGGCGCCA	GCACCTGTCT	TCAGCGCCAT	28500
TATGAGCAAG	GAAATTCCCA	CGCCCTACAT	GTGGAGTTAC	CAGCCACAAA	28550
TGGGACTTGC	GGCTGGAGCT	GCCCAAGACT	ACTCAACCCG	AATAAACTAC	28600
ATGAGCGCGG	GACCCACAT	GATATCCCGG	GTCAACGGAA	TCCGCGCCCA	28650
CCGAAACCGA	ATTCTCTTGG	AACAGGCGGC	TATTACCACC	ACACCTCGTA	28700
ATAACCTTAA	TCCCCGTAGT	TGGCCCCGCTG	CCCTGGTGTA	CCAGGAAAGT	28750
CCCGCTCCCA	CCACTGTGGT	ACTTCCCAGA	GACGCCCAGG	CCGAAGTTCA	28800
GATGACTAAC	TCAGGGGCGC	AGCTTGCGGG	CGGCTTTCGT	CACAGGGTGC	28850
GGTCGCCCGG	GCAGGGTATA	ACTCACCTGA	CAATCAGAGG	GCGAGGTATT	28900

CAGCTCAACG	ACGAGTCGGT	GAGCTCCTCG	CTTGGTCTCC	GTCCGGACGG	28950
GACATTTTCAG	ATCGGCGGCG	CCGGCCGTCC	TTCATTCACG	CCTCGTCAGG	29000
CAATCCTAAC	TCTGCAGACC	TCGTCTCTCG	AGCCGCGCTC	TGGAGGCATT	29050
GGAACCTCTGC	AATTTATTGA	GGAGTTTGTC	CCATCGGTCT	ACTTTAACCC	29100
CTTCTCGGGA	CCTCCCGGCC	ACTATCCGGA	TCAATTTATT	CCTAACTTTG	29150
ACGCGGTAAA	GGACTCGGCG	GACGGCTACG	ACTGAATGTT	AAGTGGAGAG	29200
GCAGAGCAAC	TGCGCCTGAA	ACACCTGGTC	CACTGTCGCC	GCCACAAGTG	29250
CTTTGCCCCG	GACTCCGGTG	AGTTTTGCTA	CTTTGAATTG	CCCGAGGATC	29300
ATATCGAGGG	CCCGGCGCAC	GGCGTCCGGC	TTACCGCCCA	GGGAGAGCTT	29350
GCCCGTAGCC	TGATTCGGGA	GTTTACCCAG	CGCCCCCTGC	TAGTTGAGCG	29400
GGACAGGGGA	CCCTGTGTTT	TCACTGTGAT	TTGCAACTGT	CCTAACCTTG	29450
GATTACATCA	AGATCTTTGT	TGCCATCTCT	GTGCTGAGTA	TAATAAATAC	29500
AGAAATTAAA	ATATACTGGG	GCTCCTATCG	CCATCCTGTA	AACGCCACCG	29550
TCTTCACCCG	CCCAAGCAAA	CCAAGGCGAA	CCTTACCTGG	TACTTTTAAAC	29600
ATCTCTCCCT	CTGTGATTTA	CAACAGTTTC	AACCCAGACG	GAGTGAGTCT	29650
ACGAGAGAAC	CTCTCCGAGC	TCAGCTACTC	CATCAGAAAA	AACACCACCC	29700
TCCTTACCTG	CCGGGAACGT	ACGAGTGCGT	CACCGGCCGC	TGCACCACAC	29750
CTACCGCCTG	ACCGTAAACC	AGACTTTTTTC	CGGACAGACC	TCAATAACTC	29800
TGTTTACCAG	AACAGGAGGT	GAGCTTAGAA	AACCCTTAGG	GTATTAGGCC	29850
AAAGGCGCAG	CTACTGTGGG	GTTTATGAAC	AATTCAAGCA	ACTCTACGGG	29900
CTATTCTAAT	TCAGGTTTCT	CTAGAATCGG	GGTTGGGGTT	ATTCTCTGTC	29950
TTGTGATTCT	CTTTATTCTT	ATACTAACGC	TTCTCTGCCT	AAGGCTCGCC	30000
GCCTGCTGTG	TGCACATTTG	CATTTATTGT	CAGCTTTTTA	AACGCTGGGG	30050
TCGCCACCCA	AGATGATTAG	GTACATAATC	CTAGGTTTAC	TCACCCTTGC	30100
GTCAGCCCAC	GGTACCACCC	AAAAGGTGGA	TTTTAAGGAG	CCAGCCTGTA	30150
ATGTTACATT	CGCAGCTGAA	GCTAATGAGT	GCACCACTCT	TATAAAATGC	30200

ACCACAGAAC	ATGAAAAGCT	GCTTATTTCGC	CACAAAAACA	AAATTGGCAA	30250
GTATGCTGTT	TATGCTATTT	GGCAGCCAGG	TGACACTACA	GAGTATAATG	30300
TTACAGTTTT	CCAGGGTAAA	AGTCATAAAA	CTTTTATGTA	TACTTTTCCA	30350
TTTTATGAAA	TGTGCGACAT	TACCATGTAC	ATGAGCAAAC	AGTATAAGTT	30400
GTGGCCCCCA	CAAATTGTG	TGGAAAACAC	TGGCACTTTC	TGCTGCACTG	30450
CTATGCTAAT	TACAGTGCTC	GCTTTGGTCT	GTACCCTACT	CTATATTAAA	30500
TACAAAAGCA	GACGCAGCTT	TATTGAGGAA	AAGAAAATGC	CTTAATTTAC	30550
TAAGTTACAA	AGCTAATGTC	ACCACTAACT	GCTTTACTCG	CTGCTTGCAA	30600
AACAAATTCA	AAAAGTTAGC	ATTATAATTA	GAATAGGATT	TAAACCCCCC	30650
GGTCATTTCC	TGCTCAATAC	CATTCCCCTG	AACAATTGAC	TCTATGTGGG	30700
ATATGCTCCA	GCGCTACAAC	CTTGAAGTCA	GGCTTCCTGG	ATGTCAGCAT	30750
CTGACTTTGG	CCAGCACCTG	TCCCGCGGAT	TGTTTCCAGT	CCAACTACAG	30800
CGACCCACCC	TAACAGAGAT	GACCAACACA	ACCAACGCGG	CCGCCGCTAC	30850
CGGACTTACA	TCTACCACAA	ATACACCCCA	AGTTTCTGCC	TTTGTCAATA	30900
ACTGGGATAA	CTTGGGCATG	TGGTGGTTCT	CCATAGCGCT	TATGTTTGTA	30950
TGCCTTATTA	TTATGTGGCT	CATCTGCTGC	CTAAAGCGCA	AACGCGCCCC	31000
ACCACCCATC	TATAGTCCCA	TCATTGTGCT	ACACCCAAAC	AATGATGGAA	31050
TCCATAGATT	GGACGGACTG	AAACACATGT	TCTTTTCTCT	TACAGTATGA	31100
TTAAATGAGA	CATGATTCCT	CGAGTTTTTA	TATTACTGAC	CCTTGTTGCG	31150
CTTTTTTTGTG	CGTGCTCCAC	ATTGGCTGCG	GTTTCTCACA	TCGAAGTAGA	31200
CTGCATTCCA	GCCTTCACAG	TCTATTTGCT	TTACGGATTT	GTCACCCTCA	31250
CGCTCATCTG	CAGCCTCATC	ACTGTGGTCA	TCGCCTTTAT	CCAGTGCATT	31300
GACTGGGTCT	GTGTGCGCTT	TGCATATCTC	AGACACCATC	CCCAGTACAG	31350
GGACAGGACT	ATAGCTGAGC	TTCTTAGAAT	TCTTTAATTA	TGAAATTTAC	31400
TGTGACTTTT	CTGCTGATTA	TTTGACCCCT	ATCTGCGTTT	TGTTCCCCGA	31450
CCTCCAAGCC	TCAAAGACAT	ATATCATGCA	GATTCACCTG	TATATGGAAT	31500

ATTCCAAGTT	GCTACAATGA	AAAAAGCGAT	CTTTCCGAAG	CCTGGTTATA	31550
TGCAATCATC	TCTGTTATGG	TGTTCTGCAG	TACCATCTTA	GCCCTAGCTA	31600
TATATCCCTA	CCTTGACATT	GGCTGGAAAC	GAATAGATGC	CATGAACCAC	31650
CCAACTTTCC	CCGCGCCCCG	TATGCTTCCA	CTGCAACAAG	TTGTTGCCGG	31700
CGGCTTTGTC	CCAGCCAATC	AGCCTCGCCC	CACTTCTCCC	ACCCCCACTG	31750
AAATCAGCTA	CTTTAATCTA	ACAGGAGGAG	ATGACTGACA	CCCTAGATCT	31800
AGAAATGGAC	GGAATTATTA	CAGAGCAGCG	CCTGCTAGAA	AGACGCAGGG	31850
CAGCGGCCGA	GCAACAGCGC	ATGAATCAAG	AGCTCCAAGA	CATGGTTAAC	31900
TTGCACCAAGT	GCAAAAGGGG	TATCTTTTGT	CTGGTAAAGC	AGGCCAAAGT	31950
CACCTACGAC	AGTAATACCA	CCGGACACCG	CCTTAGCTAC	AAGTTGCCAA	32000
CCAAGCGTCA	GAAATTGGTG	GTCATGGTGG	GAGAAAAGCC	CATTACCATA	32050
ACTCAGCACT	CGGTAGAAAC	CGAAGGCTGC	ATTCACTCAC	CTTGTCAAGG	32100
ACCTGAGGAT	CTCTGCACCC	TTATTAAGAC	CCTGTGCGGT	CTCAAAGATC	32150
TTATTCCCTT	TAACTAATAA	AAAAAAATAA	TAAAGCATCA	CTTACTTAAA	32200
ATCAGTTAGC	AAATTTCTGT	CCAGTTTATT	CAGCAGCACC	TCCTTGCCCT	32250
CCTCCCAGCT	CTGGTATTGC	AGCTTCCTCC	TGGCTGCAAA	CTTTCTCCAC	32300
AATCTAAATG	GAATGTCAGT	TTCCTCCTGT	TCCTGTCCAT	CCGCACCCAC	32350
TATCTTCATG	TTGTTGCAGA	TGAAGCGCGC	AAGACCGTCT	GAAGATACCT	32400
TCAACCCCGT	GTATCCATAT	GACACGGAAA	CCGGTCCTCC	AACTGTGCCT	32450
TTTCTTACTC	CTCCCTTTGT	ATCCCCAAT	GGGTTTCAAG	AGAGTCCCCC	32500
TGGGGTACTC	TCTTTGCGCC	TATCCGAACC	TCTAGTTACC	TCCAATGGCA	32550
TGCTTGCGCT	CAAAATGGGC	AACGGCCTCT	CTCTGGACGA	GGCCGGCAAC	32600
CTTACCTCCC	AAAATGTAAC	CACTGTGAGC	CCACCTCTCA	AAAAAACCAA	32650
GTCAAACATA	AACCTGGAAA	TATCTGCACC	CCTCACAGTT	ACCTCAGAAG	32700
CCCTAACTGT	GGCTGCCGCC	GCACCTCTAA	TGGTCGCGGG	CAACACACTC	32750
ACCATGCAAT	CACAGGCCCC	GCTAACCGTG	CACGACTCCA	AACTTAGCAT	32800

TGCCACCCAA	GGACCCCTCA	CAGTGTGAGA	AGGAAAGCTA	GCCCTGCAAA	32850
CATCAGGCCC	CCTCACCACC	ACCGATAGCA	GTACCCTTAC	TATCACTGCC	32900
TCACCCCCTC	TAACACTGTC	CACTGGTAGC	TTGGGCATTG	ACTTGAAAGA	32950
GCCCATTAT	ACACAAAATG	GAAAACTAGG	ACTAAAGTAC	GGGGCTCCTT	33000
TGCATGTAAC	AGACGACCTA	AACACTTTGA	CCGTAGCAAC	TGGTCCAGGT	33050
GTGACTATTA	ATAATACTTC	CTTGCAAAC	AAAGTTACTG	GAGCCTTGGG	33100
TTTTGATTCA	CAAGGCAATA	TGCAACTTAA	TGTAGCAGGA	GACTAAAGGA	33150
TTGATTCTCA	AAACAGACGC	CTTATACTTG	ATGTTAGTTA	TCCGTTTGAT	33200
GCTCAAAACC	AACTAAATCT	AAGACTAGGA	CAGGGCCCTC	TTTTTATAAA	33250
CTCAGCCCAC	AACTTGATA	TTAACTACAA	CAAAGGCCTT	TACTTGTTTA	33300
CAGCTTCAAA	CAATTCCAAA	AAGCTTGAGG	TTAACCTAAG	CACTGCCAAG	33350
GGGTTGATGT	TTGACGCTAC	AGCCATAGCC	ATTAATGCAG	GAGATGGGCT	33400
TGAATTTGGT	TCACCTAATG	CACCAAACAC	AAATCCCCTC	AAAACAAAAA	33450
TTGGCCATGG	CCTAGAATTT	GATTCAAACA	AGGCTATGGT	TCCTAAACTA	33500
GGAAGTGGCC	TTAGTTTTGA	CAGCACAGGT	GCCATTACAG	TAGGAAACAA	33550
AAATAATGAT	AAGCTAACTT	TGTGGACCAC	ACCAGCTCCA	TCTCCTAACT	33600
GTAGACTAAA	TGCAGAGAAA	GATGCTAAAC	TCACCTTGGT	CTTAACAAAA	33650
TGTGGCAGTC	AAATACTTGC	TACAGTTTCA	GTTTTGGCTG	TTAAAGGCAG	33700
TTTGGCTCCA	ATATCTGGAA	CAGTTCAAAG	TGCTCATCTT	ATTATAAGAT	33750
TTGACGAAAA	TGGAGTGCTA	CTAAACAATT	CCTTCCTGGA	CCCAGAATAT	33800
TGGAACCTTA	GAAATGGAGA	TCTTACTGAA	GGCACAGCCT	ATACAAACGC	33850
TGTTGGATTT	ATGCCTAACC	TATCAGCTTA	TCCAAAATCT	CACGGTAAAA	33900
CTGCCAAAAG	TAACATTGTC	AGTCAAGTTT	ACTTAAACGG	AGACAAAAC	33950
AAACCTGTAA	CACTAACCAT	TACACTAAAC	GGTACACAGG	AAACAGGAGA	34000
CACAACTCCA	AGTGCATACT	CTATGTCATT	TTCATGGGAC	TGGTCTGGCC	34050
ACAACTACAT	TAATGAAATA	TTTGCCACAT	CCTCTTACAC	TTTTTCATAC	34100

ATTGCCCAAG	AATAAAGAAT	CGTTTGTGTT	ATGTTTCAAC	GTGTTTATTT	34150
TTCAATTGCA	GAAAATTTCA	AGTCATTTTT	CATTCAGTAG	TATAGCCCCA	34200
CCACCACATA	GCTTATACAG	ATCACCGTAC	CTTAATCAAA	CTCACAGAAC	34250
CCTAGTATTC	AACCTGCCAC	CTCCCTCCCA	ACACACAGAG	TACACAGTCC	34300
TTTCTCCCCG	GCTGGCCTTA	AAAAGCATCA	TATCATGGGT	AACAGACATA	34350
TTCTTAGGTG	TTATATTCCA	CACGGTTTCC	TGTCGAGCCA	AACGCTCATC	34400
AGTGATATTA	ATAAACTGGC	GGCGATATAA	AATGCAAGGT	GCTGCTCAAA	34450
AAATCAGGCA	AAGCCTCGCG	CAAAAAAGAA	AGCACATCGT	AGTCATGCTC	34500
ATGCAGATAA	AGGCAGGTAA	GCTCCGGAAC	CACCACAGAA	AAAGACACCA	34550
TTTTTCTCTC	AAACATGTCT	GCGGGTTTCT	GCATAAACAC	AAAATAAAAT	34600
AACAAAAAAA	CATTTAAACA	TTAGAAGCCT	GTCTTACAAC	AGGAAAAACA	34650
ACCCTTATAA	GCATAAGACG	GACTACGGCC	ATGCCGGCGT	GACCGTAAAA	34700
AAACTGGTCA	CCGTGATTAA	AAAGCACCAC	CGACAGCTCC	TCGGTCATGT	34750
CCGGAGTCAT	AATGTAAGAC	TCGGTAAACA	CATCAGGTTG	ATTCATCGGT	34800
CAGTGCTAAA	AAGCGACCGA	AATAGCCCCG	GGGAATACAT	ACCCGCAGGC	34850
GTAGAGACAA	CATTACAGCC	CCCATAGGAG	GTATAACAAA	ATTAATAGGA	34900
GAGAAAAACA	CATAAACACC	TGAAAAACCC	TCCTGCCTAG	GCAAAATAGC	34950
ACCCTCCCGC	TCCAGAACAA	CATACAGCGC	TTCACAGCGG	CAGCCTAACA	35000
GTCAGCCTTA	CCAGTAAAAA	AGAAAAACCTA	TTAAAAAAAC	ACCACTCGAC	35050
ACGGCACCAG	CTCAATCAGT	CACAGTGTA	AAAAGGGCCA	AGTGCAGAGC	35100
GAGTATATAT	AGGACTAAAA	AATGACGTAA	CGGTAAAGT	CCACAAAAAA	35150
CACCCAGAAA	ACCGCACGCG	AACCTACGCC	CAGAAACGAA	AGCCAAAAAA	35200
CCCACAACCT	CCTCAAATCG	TCACTTCCGT	TTCCACCGT	TACGTAACCT	35250
CCCATTTTAA	GAAAACTACA	ATTCCCAACA	CATACAAGTT	ACTCCGCCCT	35300
AAAACCTACG	TCACCCGCCC	CGTTCCACG	CCCCGCGCCA	CGTCACAAAC	35350

TCCACCCCCT CATTATCATA TTGGCTTCAA TCCAAAATAA GGTATATTAT 35400
 TGATGATG 35408

(2) 配列番号4の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 8509塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 関係なし

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: 配列番号4

GCCCAATACG CAAACCGCCT CTCCCCGCGC GTTGGCCGAT TCATTAATGC	50
AGCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG CCCGGGCAA GCGCGGCGT	100
CGGGCGACCT TTGGTCGCCC GGCCTCAGTG AGCGAGCGAG CGCGCAGAGA	150
GGGAGTGGCC AACTCCATCA CTAGGGGTTT CTTGTAGTTA ATGATTAACC	200
CGCCATGCTA CTTATCTACG TAGCCATTCT CTAGCCCCTG CAGGTCGTTA	250
CATAACTTAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA CGACCCCCGC	300
CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC	350
TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG	400
CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT	450
GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA	500
CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG	550
TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG GTTTGACTCA	600
CGGGGATTTC CAAGTCTCCA CCCCATTTGAC GTCAATGGGA GTTTGTTTTG	650
GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCCAT	700
TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA	750
GCTCGTTTAG TGAACGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC CACGCTGTTT	800
TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGG ACTCTAGAGG	850
ATCCGGTACT CGAGGAACTG AAAAACCAGA AAGTTAACTG GTAAGTTTAG	900

TCTTTTTGTC	TTTTATTTCA	GGTCCCGGAT	CCGGTGGTGG	TGCAAATCAA	950
AGAACTGCTC	CTCAGTGGAT	GTTGCCTTTA	CTTCTAGGCC	TGTACGGAAG	1000
TGTTACTTCT	GCTCTAAAAG	CTGCGGAATT	GTACCCGCGG	CCGCAATTCC	1050
CGGGGATCGA	AAGAGCCTGC	TAAAGCAAAA	AAGAAGTCAC	CATGTCGTTT	1100
ACTTTGACCA	ACAAGAACGT	GATTTTCGTT	GCCGGTCTGG	GAGGCATTGG	1150
TCTGGACACC	AGCAAGGAGC	TGCTCAAGCG	CGATCCCGTC	GTTTTACAAC	1200
GTCGTGACTG	GGAAAACCTT	GGCGTTACCC	AACTTAATCG	CCTTGACGCA	1250
CATCCCCCTT	TCGCCAGCTG	GCGTAATAGC	GAAGAGGCCC	GCACCGATCG	1300
CCCTTCCCAA	CAGTTGCGCA	GCCTGAATGG	CGAATGGCGC	TTTGCCTGGT	1350
TTCCGGCACC	AGAAGCGGTG	CCGGAAGCT	GGCTGGAGTG	CGATCTTCCT	1400
GAGGCCGATA	CTGTCGTCGT	CCCCTCAAAC	TGGCAGATGC	ACGGTTACGA	1450
TGCGCCCATC	TACACCAACG	TAACCTATCC	CATTACGGTC	AATCCGCCGT	1500
TTGTTCCAC	GGAGAATCCG	ACGGGTTGTT	ACTCGCTCAC	ATTTAATGTT	1550
GATGAAAGCT	GGCTACAGGA	AGGCCAGACG	CGAATTATTT	TTGATGGCGT	1600
TAACCTCGCG	TTTCATCTGT	GGTGCAACGG	GCGCTGGGTC	GGTTACGGCC	1650
AGGACAGTCG	TTTGCCGTCT	GAATTTGACC	TGAGCGCATT	TTTACGCGCC	1700
GGAGAAAACC	GCCTCGCGGT	GATGGTGCTG	CGTTGGAGTG	ACGGCAGTTA	1750
TCTGGAAGAT	CAGGATATGT	GGCGGATGAG	CGGCATTTTC	CGTGACGTCT	1800
CGTTGCTGCA	TAAACCGACT	ACACAAATCA	GCGATTTCCA	TGTTGCCACT	1850
CGCTTTAATG	ATGATTTTCA	CCGCGCTGTA	CTGGAGGCTG	AAGTTCAGAT	1900
GTGCGGCGAG	TTGCGTGA	ACCTACGGGT	AACAGTTTCT	TTATGGCAGG	1950
GTGAAACGCA	GGTCGCCAGC	GGCACCGCGC	CTTTCGGCGG	TGAAATTATC	2000
GATGAGCGTG	GTGGTTATGC	CGATCGCGTC	ACACTACGTC	TGAACGTCGA	2050
AAACCCGAAA	CTGTGGAGCG	CCGAAATCCC	GAATCTCTAT	CGTGCGGTGG	2100
TTGAACTGCA	CACCGCCGAC	GGCACGCTGA	TTGAAGCAGA	AGCCTGCGAT	2150
GTCGGTTTCC	GCGAGGTGCG	GATTGAAAAT	GGTCTGCTGC	TGCTGAACGG	2200

CAAGCCGTTG	CTGATTCGAG	GCGTTAACCG	TCACGAGCAT	CATCCTCTGC	2250
ATGGTCAGGT	CATGGATGAG	CAGACGATGG	TGCAGGATAT	CCTGCTGATG	2300
AAGCAGAACA	ACTTTAACGC	CGTGCGCTGT	TCGCATTATC	CGAACCATCC	2350
GCTGTGGTAC	ACGCTGTGCG	ACCGCTACGG	CCTGTATGTG	GTGGATGAAG	2400
CCAATATTGA	AACCCACGGC	ATGGTGCCAA	TGAATCGTCT	GACCGATGAT	2450
CCGCGCTGGC	TACCGGCGAT	GAGCGAACGC	GTAACGCGAA	TGGTGCAGCG	2500
CGATCGTAAT	CACCCGAGTG	TGATCATCTG	GTCGCTGGGG	AATGAATCAG	2550
GCCACGGCGC	TAATCACGAC	GCGCTGTATC	GCTGGATCAA	ATCTGTCGAT	2600
CCTTCCCGCC	CGGTGCAGTA	TGAAGGCGGC	GGAGCCGACA	CCACGGCCAC	2650
CGATATTATT	TGCCCCGATGT	ACGCGCGCGT	GGATGAAGAC	CAGCCCTTCC	2700
CGGCTGTGCC	GAAATGGTCC	ATCAAAAAAT	GGCTTTCGCT	ACCTGGAGAG	2750
ACGCGCCCCG	TGATCCTTTG	CGAATACGCC	CACGCGATGG	GTAACAGTCT	2800
TGGCGGTTTC	GCTAAATACT	GGCAGGCGTT	TCGTCAGTAT	CCCCGTTTAC	2850
AGGGCGGCTT	CGTCTGGGAC	TGGGTGGATC	AGTCGCTGAT	TAAATATGAT	2900
GAAAACGGCA	ACCCGTGGTC	GGCTTACGGC	GGTGATTTTG	GCGATACGCC	2950
GAACGATCGC	CAGTTCTGTA	TGAACGGTCT	GGTCTTTGCC	GACCGCACGC	3000
CGCATCCAGC	GCTGACGGAA	GCAAAACACC	AGCAGCAGTT	TTTCCAGTTC	3050
CGTTTATCCG	GGCAAACCAT	CGAAGTGACC	AGCGAATACC	TGTTCCGTCA	3100
TAGCGATAAC	GAGCTCCTGC	ACTGGATGGT	GGCGCTGGAT	GGTAAGCCGC	3150
TGGCAAGCGG	TGAAGTGCCT	CTGGATGTCC	CTCCACAAGG	TAAACAGTTG	3200
ATTGAACTGC	CTGAACTACC	GCAGCCGGAG	AGCGCCGGGC	AACTCTGGCT	3250
CACAGTACGC	GTAGTGCAAC	CGAACGCGAC	CGCATGGTCA	GAAGCCGGGC	3300
ACATCAGCGC	CTGGCAGCAG	TGGCGTCTGG	CGGAAAACCT	CAGTGTGACG	3350
CTCCCCGCCG	CGTCCCACGC	CATCCCGCAT	CTGACCACCA	GCGAAATGGA	3400
TTTTTGCATC	GAGCTGGGTA	ATAAGCGTTG	GCAATTTAAC	CGCCAGTCAG	3450
GCTTTCTTTC	ACAGATGTGG	ATTGGCGATA	AAAAACAAC	GCTGACGCCG	3500

CTGCGCGATC	AGTTCACCCG	TGCACCGCTG	GATAACGACA	TTGGCGTAAG	3550
TGAAGCGACC	CGCATTGACC	CTAACGCCTG	GGTCGAACGC	TGGAAGGCGG	3600
CGGGCCATTA	CCAGGCCGAA	GCAGCGTTGT	TGCAGTGCAC	GGCAGATACA	3650
CTTGCTGATG	CGGTGCTGAT	TACGACCGCT	CACGCGTGGC	AGCATCAGGG	3700
GAAAACCTTA	TTTATCAGCC	GGAAAACCTA	CCGGATTGAT	GGTAGTGGTC	3750
AAATGGCGAT	TACCGTTGAT	GTTGAAGTGG	CGAGCGATAC	ACCGCATCCG	3800
GCGCGGATTG	GCCTGAACTG	CCAGCTGGCG	CAGGTAGCAG	AGCGGGTAAA	3850
CTGGCTCGGA	TTAGGGCCGC	AAGAAAATA	TCCCGACCGC	CTTACTGCCG	3900
CCTGTTTTGA	CCGCTGGGAT	CTGCCATTGT	CAGACATGTA	TACCCCGTAC	3950
GTCTTCCCGA	GCGAAAACGG	TCTGCGCTGC	GGGACGCGCG	AATTGAATTA	4000
TGGCCACAC	CAGTGGCGCG	GCGACTTCCA	GTTCAACATC	AGCCGCTACA	4050
GTCAACAGCA	ACTGATGGAA	ACCAGCCATC	GCCATCTGCT	GCACGCGGAA	4100
GAAGGCACAT	GGCTGAATAT	CGACGGTTTC	CATATGGGGA	TTGGTGGCGA	4150
CGACTCCTGG	AGCCCGTCAG	TATCGGCGGA	ATTACAGCTG	AGCGCCGGTC	4200
GCTACCATTA	CCAGTTGGTC	TGGTGTCAAA	AATAATAATA	ACCGGGCAGG	4250
CCATGTCTGC	CCGTATTTTCG	CGTAAGGAAA	TCCATTATGT	ACTATTTTAA	4300
AAACACAAAC	TTTTGGATGT	TCGGTTTATT	CTTTTTCTTT	TACTTTTTTTA	4350
TCATGGGAGC	CTACTTCCCG	TTTTTCCCGA	TTTGGCTACA	TGACATCAAC	4400
CATATCAGCA	AAAGTGATAC	GGGTATTATT	TTTGCCGCTA	TTTCTCTGTT	4450
CTCGCTATTA	TTCCAACCGC	TGTTTGGTCT	GCTTTCTGAC	AAACTCGGCC	4500
TCGACTCTAG	GCGGCCGCGG	GGATCCAGAC	ATGATAAGAT	ACATTGATGA	4550
GTTTGGACAA	ACCACAATA	GAATGCAGTG	AAAAAAATGC	TTTATTTGTG	4600
AAATTTGTGA	TGCTATTGCT	TTATTTGTAA	CCATTATAAG	CTGCAATAAA	4650
CAAGTTAACA	ACAACAATTG	CATTCATTTT	ATGTTTCAGG	TTCAGGGGGA	4700
GGTGTGGGAG	GTTTTTTCGG	ATCCTCTAGA	GTCGACCTGC	AGGGGCTAGA	4750
ATGGCTACGT	AGATAAGTAG	CATGGCGGGT	TAATCATTA	CTACAAGGAA	4800

CCCCTAGTGA	TGGAGTTGGC	CACTCCCTCT	CTGCGCGCTC	GCTCGCTCAC	4850
TGAGGCCGGG	CGACCAAAGG	TCGCCCCGACG	CCCGGGCTTT	GCCCGGGCGG	4900
CCTCAGTGAG	CGAGCGAGCG	CGCAGCTGGC	GTAATAGCGA	AGAGGCCCGC	4950
ACCGATCGCC	CTTCCCAACA	GTTGCGCAGC	CTGAATGGCG	AATGGAATTC	5000
CAGACGATTG	AGCGTCAAAA	TGTAGGTATT	TCCATGAGCG	TTTTTCCTGT	5050
TGCAATGGCT	GGCGGTAATA	TTGTTCTGGA	TATTACCAGC	AAGGCCGATA	5100
GTTTGAGTTC	TTCTACTCAG	GCAAGTGATG	TTATTACTAA	TCAAAGAAGT	5150
ATTGCGACAA	CGGTTAATTT	GCGTGATGGA	CAGACTCTTT	TACTCGGTGG	5200
CCTCACTGAT	TATAAAAACA	CTTCTCAGGA	TTCTGGCGTA	CCGTTCTCTGT	5250
CTAAAATCCC	TTTAATCGGC	CTCCTGTTTA	GCTCCCGCTC	TGATTCTAAC	5300
GAGGAAAGCA	CGTTATACGT	GCTCGTCAAA	GCAACCATAG	TACGCGCCCT	5350
GTAGCGGCGC	ATTAAGCGCG	GCGGGTGTGG	TGGTTACGCG	CAGCGTGACC	5400
GCTACACTTG	CCAGCGCCCT	AGCGCCCGCT	CCTTTCGCTT	TCTTCCCTTC	5450
CTTTCTCGCC	ACGTTTCGCCG	GCTTTCCCCG	TCAAGCTCTA	AATCGGGGGC	5500
TCCCTTTAGG	GTTCCGATTT	AGTGCTTTAC	GGCACCTCGA	CCCCAAAAAA	5550
CTTGATTAGG	GTGATGGTTC	ACGTAGTGGG	CCATCGCCCT	GATAGACGGT	5600
TTTTCGCCCT	TTGACGTTGG	AGTCCACGTT	CTTTAATAGT	GGACTCTTGT	5650
TCCAAACTGG	AACAACACTC	AACCCTATCT	CGGTCTATTC	TTTTGATTTA	5700
TAAGGGATTT	TGCCGATTTT	GGCCTATTGG	TTAAAAAATG	AGCTGATTTA	5750
ACAAAAATTT	AACGCGAATT	TTAACAAAAT	ATTAACGTTT	ACAATTTAAA	5800
TATTTGCTTA	TACAATCTTC	CTGTTTTTGG	GGCTTTTCTG	ATTATCAACC	5850
GGGGTACATA	TGATTGACAT	GCTAGTTTTA	CGATTACCGT	TCATCGATTC	5900
TCTTGTTTGC	TCCAGACTCT	CAGGCAATGA	CCTGATAGCC	TTGTTAGAGA	5950
CCTCTCAAAA	ATAGCTACCC	TCTCCGGCAT	GAATTTATCA	GCTAGAACGG	6000
TTGAATATCA	TATTGATGGT	GATTTGACTG	TCTCCGGCCT	TTCTCACCCG	6050
TTTGAATCTT	TACCTACACA	TTACTCAGGC	ATTGCATTTA	AAATATATGA	6100

GGGTTCTAAA	AATTTTATC	CTTGCGTTGA	AATAAAGGCT	TCTCCCGCAA	6150
AAGTATTACA	GGGTCATAAT	GTTTTTGGA	CAACCGATTT	AGCTTTATGC	6200
TCTGAGGCTT	TATTGCTTAA	TTTGCTAAT	TCTTTGCCTT	GCCTGTATGA	6250
TTTATTGGAT	GTTGGAATTC	CTGATGCGGT	ATTTTCTCCT	TACGCATCTG	6300
TGCGGTATTT	CACACCGCAT	ATGGTGCACT	CTCAGTACAA	TCTGCTCTGA	6350
TGCCGCATAG	TTAAGCCAGC	CCCGACACCC	GCCAACACCC	GCTGACGCGC	6400
CCTGACGGGC	TTGTCTGCTC	CCGGCATCCG	CTTACAGACA	AGCTGTGACC	6450
GTCTCCGGGA	GCTGCATGTG	TCAGAGGTTT	TCACCGTCAT	CACCGAAACG	6500
CGCGAGACGA	AAGGGCCTCG	TGATACGCCT	ATTTTTATAG	GTTAATGTCA	6550
TGATAATAAT	GGTTTCTTAG	ACGTCAGGTG	GCACTTTTCG	GGGAAATGTG	6600
CGCGGAACCC	CTATTTGTTT	ATTTTTCTAA	ATACATTCAA	ATATGTATCC	6650
GCTCATGAGA	CAATAACCCT	GATAAATGCT	TCAATAATAT	TGAAAAAGGA	6700
AGAGTATGAG	TATTCAACAT	TTCCGTGTG	CCCTTATTCC	CTTTTTTGCG	6750
GCATTTTGCC	TTCTTGTTTT	TGCTCACCCA	GAAACGCTGG	TGAAAGTAAA	6800
AGATGCTGAA	GATCAGTTGG	GTGCACGAGT	GGGTTACATC	GAAGTGGATC	6850
TCAACAGCGG	TAAGATCCTT	GAGAGTTTTC	GCCCCGAAGA	ACGTTTTCCA	6900
ATGATGAGCA	CTTTTAAAGT	TCTGCTATGT	GGCGCGGTAT	TATCCCGTAT	6950
TGACGCCGGG	CAAGAGCAAC	TCGGTCGCCG	CATACACTAT	TCTCAGAATG	7000
ACTTGGTGTA	GTACTCACCA	GTCACAGAAA	AGCATCTTAC	GGATGGCATG	7050
ACAGTAAGAG	AATTATGCAG	TGCTGCCATA	ACCATGAGTG	ATAACACTGC	7100
GGCCAACTTA	CTTCTGACAA	CGATCGGAGG	ACCGAAGGAG	CTAACCGCTT	7150
TTTTGCACAA	CATGGGGGAT	CATGTAACTC	GCCTTGATCG	TGGGAACCG	7200
GAGCTGAATG	AAGCCATACC	AAACGACGAG	CGTGACACCA	CGATGCCTGT	7250
AGCAATGGCA	ACAACGTTGC	GCAAACATT	AACTGGCGAA	CTACTTACTC	7300
TAGCTTCCCG	GCAACAATTA	ATAGACTGGA	TGGAGGCGGA	TAAAGTTGCA	7350
GGACCACTTC	TGCGCTCGGC	CCTTCCGGCT	GGCTGGTTTA	TTGCTGATAA	7400

ATCTGGAGCC	GGTGAGCGTG	GGTCTCGCGG	TATCATTGCA	GCACTGGGGC	7450
CAGATGGTAA	GGCCTCCCGT	ATCGTAGTTA	TCTACACGAC	GGGGAGTCAG	7500
GCAACTATGG	ATGAACGAAA	TAGACAGATC	GCTGAGATAG	GTGCCTCACT	7550
GATTAAGCAT	TGGTAACTGT	CAGACCAAGT	TTACTCATAT	ATACTTTAGA	7600
TTGATTTAAA	ACTTCATTTT	TAATTTAAAA	GGATCTAGGT	GAAGATCCTT	7650
TTTGATAATC	TCATGACCAA	AATCCCTTAA	CGTGAGTTTT	CGTTCCACTG	7700
AGCGTCAGAC	CCCGTAGAAA	AGATCAAAGG	ATCTTCTTGA	GATCCTTTTT	7750
TTCTGCGCGT	AATCTGCTGC	TTGCAAACAA	AAAAACCACC	GCTACCAGCG	7800
GTGGTTTGTT	TGCCGGATCA	AGAGCTACCA	ACTCTTTTTT	CGAAGGTAAC	7850
TGGCTTCAGC	AGAGCGCAGA	TACCAAATAC	TGTCCTTCTA	GTGTAGCCGT	7900
AGTTAGGCCA	CCACTTCAAG	AACTCTGTAG	CACCGCCTAC	ATACCTCGCT	7950
CTGCTAATCC	TGTTACCAGT	GGCTGCTGCC	AGTGGCGATA	AGTCGTGTCT	8000
TACCGGGTTG	GA CTCAAGAC	GATAGTTACC	GGATAAGGCG	CAGCGGTCGG	8050
GCTGAACGGG	GGGTTCGTGC	ACACAGCCCA	GCTTGAGCG	AACGACCTAC	8100
ACCGAACTGA	GATACCTACA	GCGTGAGCTA	TGAGAAAGCG	CCACGCTTCC	8150
CGAAGGGAGA	AAGGCGGACA	GGTATCCGGT	AAGCGGCAGG	GTCGGAACAG	8200
GAGAGCGCAC	GAGGGAGCTT	CCAGGGGGAA	ACGCCTGGTA	TCTTTATAGT	8250
CCTGTGCGGT	TTCGCCACCT	CTGACTTGAG	CGTCGATTTT	TGTGATGCTC	8300
GTCAGGGGGG	CGGAGCCTAT	GGAAAAACGC	CAGCAACGCG	GCCTTTTTTAC	8350
GGTTCCTGGC	CTTTTGCTGG	CCTTTTGCTC	ACATGTTCTT	TCCTGCGTTA	8400
TCCCTTGATT	CTGTGGATAA	CCGTATTACC	GCCTTTGAGT	GAGCTGATAC	8450
CGCTCGCCGC	AGCCGAACGA	CCGAGCGCAG	CGAGTCAGTG	AGCGAGGAAG	8500
CGGAAGAGC					8509

(2) 配列番号5の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 8299塩基対

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 二本鎖

(D) トポロジー: 関係なし

(ii) 配列の種類: cDNA

(xi) 配列: 配列番号5

GCCCAATACG CAAACCGCCT CTCCCCGCGC GTTGGCCGAT TCATTAATGC	50
AGCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG CCCGGGCAAA GCCCGGGCGT	100
CGGGCGACCT TTGGTCGCCC GGCCTCAGTG AGCGAGCGAG CGCGCAGAGA	150
GGGAGTGGCC AACTCCATCA CTAGGGGTTC CTTGTAGTTA ATGATTAACC	200
CGCCATGCTA CTTATCTACA TCATCGATGA ATTCGAGCTT GCATGCCTGC	250
AGGTCGTTAC ATAACCTACG GTAAATGGCC CGCCTGGCTG ACCGCCCCAAC	300
GACCCCCGCC CATTGACGTC AATAATGACG TATGTTCCCA TAGTAACGCC	350
AATAGGGACT TTCCATTGAC GTCAATGGGT GGAGTATTTA CGGTAAACTG	400
CCCACCTGGC AGTACATCAA GTGTATCATA TGCCAAGTAC GCCCCCTATT	450
GACGTCAATG ACGGTAAATG GCCCGCCTGG CATTATGCCC AGTACATGAC	500
CTTATGGGAC TTTCTACTT GGCAGTACAT CTACGTATTA GTCATCGCTA	550
TTACCATGGT GATGCGGTTT TGGCAGTACA TCAATGGGCG TGGATAGCGG	600
TTTGACTCAC GGGGATTTCC AAGTCTCCAC CCCATTGACG TCAATGGGAG	650
TTTGTTTTTG CACCAAATC AACGGGACTT TCCAAATGT CGTAACAAC	700
CCGCCCCATT GACGCAAATG GCGGTAGGC GTGTACGGTG GGAGGTCTAT	750
ATAAGCAGAG CTCGTTTAGT GAACCGTCAG ATCGCCTGGA GACGCCATCC	800
ACGCTGTTTT GACCTCCATA GAAGACACCG GGACCGATCC AGCCTCCGGA	850
CTCTAGAGGA TCCGGTACTC GACCCGAGCT CGGATCCACT AGTAACGGCC	900
GCCAGTGTGC TGGAATTCTG CACTCCAGGC TGCCCGGGT TGCATGCTGC	950
TGCTGCTGCT GCTGCTGGGC CTGAGGCTAC AGCTCTCCCT GGGCATCATC	1000

CTAGTTGAGG	AGGAGAACCC	GGACTTCTGG	AACCGCGAGG	CAGCCGAGGC	1050
CCTGGGTGCC	GCCAAGAAGC	TGCAGCCTGC	ACAGACAGCC	GCCAAGAACC	1100
TCATCATCTT	CCTGGGCGAT	GGGATGGGGG	TGTCTACGGT	GACAGCTGCC	1150
AGGATCCTAA	AAGGGCAGAA	GAAGGACAAA	CTGGGGCCTG	AGATACCCCT	1200
GGCCATGGAC	CGCTTCCCAT	ATGTGGCTCT	GTCCAAGACA	TACAATGTAG	1250
ACAAACATGT	GCCAGACAGT	GGAGCCACAG	CCACGGCCTA	CCTGTGCGGG	1300
GTCAAGGGCA	ACTTCCAGAC	CATTGGCTTG	AGTGCAGCCG	CCCGCTTTAA	1350
CCAGTGCAAC	ACGACACGCG	GCAACGAGGT	CATCTCCGTG	ATGAATCGGG	1400
CCAAGAAAGC	AGGGAAGTCA	GTGGGAGTGG	TAACCACCAC	ACGAGTGCAG	1450
CACGCCTCGC	CAGCCGGCAC	CTACGCCCAC	ACGGTGAACC	GCAACTGGTA	1500
CTCGGACGCC	GACGTGCCTG	CCTCGGCCCC	CCAGGAGGGG	TGCCAGGACA	1550
TCGCTACGCA	GCTCATCTCC	AACATGGACA	TTGATGTGAT	CCTAGGTGGA	1600
GGCCGAAAGT	ACATGTTTCG	CATGGGAACC	CCAGACCCTG	AGTACCCAGA	1650
TGACTACAGC	CAAGGTGGGA	CCAGGCTGGA	CGGGAAGAAT	CTGGTGCAGG	1700
AATGGCTCGG	CGAACGCCAG	GGTGCCCGGT	ACGTGTGGAA	CCGCACTGAG	1750
CTCATGCAGG	CTTCCCTGGA	CCCGTCTGTG	ACCCATCTCA	TGGGTCTCTT	1800
TGAGCCTGGA	GACATGAAAT	ACGAGATCCA	CCGAGACTCC	ACACTGGACC	1850
CCTCCCTGAT	GGAGATGACA	GAGGCTGCCC	TGCGCCTGCT	GAGCAGACAC	1900
CCCCGCGGCT	TCTTCCTCTT	CGTGGAGGGT	GGTCGCATCG	ACCATGGTCA	1950
TCATGAAAGC	AGGGCTTACC	GGGCACTGAC	TGAGACGATC	ATGTTGACG	2000
ACGCCATTGA	GAGGGCGGGC	CAGCTCACCA	GCGAGGAGGA	CACGCTGAGC	2050
CTCGTCACTG	CCGACCACTC	CCACGTCTTC	TCCTTCGGAG	GCTACCCCTT	2100
GCGAGGGAGC	TCCTTCATCG	GGCTGGCCGC	TGGCAAGGCC	CGGGACAGGA	2150
AGGCCTACAC	GGTCCTCCTA	TACGGAAACG	GTCCAGGCTA	TGTGCTCAAG	2200
GACGGCGCCC	GGCCGGATGT	TACCGAGAGC	GAGAGCGGGA	GCCCCGAGTA	2250
TCGGCAGCAG	TCAGCAGTGC	CCCTGGACGA	AGAGACCCAC	GCAGGCGAGG	2300

ACGTGGCGGT GTTCGCGCGC GGCCCGCAGG CGCACCTGGT TCACGGCGTG	2350
CAGGAGCAGA CCTTCATAGC GCACGTCATG GCCTTCGCCG CCTGCCTGGA	2400
GGCCTACACC GCCTGCGACC TGGCGCCCCC CGCCGGCACC ACCGACGCCG	2450
CGCACCCGGG GCGGTCCGTG GTCCCCGCGT TGCTTCCTCT GCTGGCCGGG	2500
ACCCTGCTGC TGCTGGAGAC GGCCACTGCT CCCTGAGTGT CCCGTCCCTG	2550
GGGCTCCTGC TTCCCCATCC CGGAGTTCTC CTGCTCCCCA CCTCCTGTGC	2600
TCCTGCCTGG CCTCCAGCCC GAGTCGTCAT CCCC GGAGTC CCTATACAGA	2650
GGTCCTGCCA TGGAACCTTC CCCTCCCCGT GCGCTCTGGG GACTGAGCCC	2700
ATGACACCAA ACCTGCCCCCT TGGCTGCTCT CGGACTCCCT ACCCCAACCC	2750
CAGGGACTGC AGGTTGTGCC CTGTGGCTGC CTGCACCCCA GGAAAGGAGG	2800
GGGCTCAGGC CATCCAGCCA CCACCTACAG CCCAGTGGGG TCGAGACAGA	2850
TGGTCAGTCT GGAGGATGAC GTGGCGTGAA GCTGGCCCGG GGGATCCAGA	2900
CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACT AGAATGCAGT	2950
GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA	3000
ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT GCATTCATTT	3050
TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GCTTTTTCG GATCCTCTAG	3100
AGTCGACTCT AGANNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN	3150
NNNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN	3200
NNNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN	3250
NNNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN	3300
NNNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN	3350
NNNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNN NNGGATCCC	3400
CATGACTACG TCCGGCGTTC CATTTGGCAT GACACTACGA CCAACACGAT	3450
CTCGGTTGTC TCGGCGCACT CCGTACAGTA GGGATCGTCT ACCTCCTTTT	3500
GAGACAGAAA CCCGCGCTAC CATACTGGAG GATCATCCGC TGCTGCCCGA	3550
ATGTAACACT TTGACAATGC ACAACGTGAG TTACGTGCGA GGTCTTCCCT	3600

GCAGTGTGGG ATTTACGCTG ATTCAGGAAT GGGTTGTTCC CTGGGATATG	3650
GTTCTAACGC GGGAGGAGCT TGTAATCCTG AGGAAGTGTA TGCACGTGTG	3700
CCTGTGTTGT GCCAACATTG ATATCATGAC GAGCATGATG ATCCATGGTT	3750
ACGAGTCCTG GGCTCTCCAC TGTCATTGTT CCAGTCCCGG TTCCCTGCAG	3800
TGTATAGCCG GCGGGCAGGT TTTGGCCAGC TGGTTTAGGA TGGTGGTGGG	3850
TGGCGCCATG TTTAATCAGA GGTTTATATG GTACCGGGAG GTGGTGAATT	3900
ACAACATGCC AAAAGAGGTA ATGTTTATGT CCAGCGTGTT TATGAGGGGT	3950
CGCCACTTAA TCTACCTGCG CTTGTGGTAT GATGGCCACG TGGGTTCTGT	4000
GGTCCCCGCC ATGAGCTTTG GATACAGCGC CTTGCACTGT GGGATTTTGA	4050
ACAATATTGT GGTGCTGTGC TGCAGTTACT GTGCTGATTT AAGTGAGATC	4100
AGGGTGCGCT GCTGTGCCCC GAGGACAAGG CGCCTTATGC TGCGGGCGGT	4150
GCGAATCATC GCTGAGGAGA CCACTGCCAT GTTGTATTCC TGCAGGACGG	4200
AGCGGCGGCG GCAGCAGTTT ATTCGCGCGC TGCTGCAGCA CCACCGCCCT	4250
ATCCTGATGC ACGATTATGA CTCTACCCCC ATGTAGGGAT CCCCATCACT	4300
AGTGCGGCCC CGGGGATCCA GACATGATAA GATACATTGA TGAGTTTGGA	4350
CAAACCACAA CTAGAATGCA GTGAAAAAAA TGCTTTATTT GTGAAATTTG	4400
TGATGCTATT GCTTTATTTG TAACCATTAT AAGCTGCAAT AAACAAGTTA	4450
ACAACAACAA TTGCATTTCAT TTTATGTTTC AGGTTCAAGG GGAGGTGTGG	4500
GAGGTTTTTT CGGATCCTCT AGAGTCGACC TGCAGGCATG CAAGCTGTAG	4550
ATAAGTAGCA TGGCGGGTTA ATCATTAAC TACAAGGAACC CCTAGTGATG	4600
GAGTTGGCCA CTCCCTCTCT GCGCGCTCGC TCGCTCACTG AGGCCGGGGC	4650
ACCAAAGGTC GCCCGACGCC CGGGCTTTGC CCGGGCGGCC TCAGTGAGCG	4700
AGCGAGCGCG CAGCTGGCGT AATAGCGAAG AGGCCCGCAC CGATCGCCCT	4750
TCCCAACAGT TGCGCAGCCT GAATGGCGAA TGGAANTTCC AGACGATTGA	4800
GCGTCAAAAT GTAGGTATTT CCATGAGCGT TTTTCCTGTT GCAATGGCTG	4850
GCGGTAATAT TGTTCTGGAT ATTACCAGCA AGGCCGATAG TTTGAGTTCT	4900

TCTACTCAGG	CAAGTGATGT	TATTACTAAT	CAAAGAAGTA	TTGCGACAAC	4950
GGTTAATTTG	CGTGATGGAC	AGACTCTTTT	ACTCGGTGGC	CTCACTGATT	5000
ATAAAAACAC	TTCTCAGGAT	TCTGGCGTAC	CGTTCCTGTC	TAAAATCCCT	5050
TTAATCGGCC	TCCTGTTTAG	CTCCCGCTCT	GATTCTAACG	AGGAAAGCAC	5100
GTTATACGTG	CTCGTCAAAG	CAACCATAGT	ACGCGCCCTG	TAGCGGCGCA	5150
TTAAGCGCGG	CGGGTGTTGT	GGTTACGCGC	AGCGTGACCG	CTACACTTGC	5200
CAGCGCCCTA	GCGCCCGCTC	CTTTCGCTTT	CTTCCCTTCC	TTTCTCGCCA	5250
CGTTCGCCGG	CTTCCCCCGT	CAAGCTCTAA	ATCGGGGGCT	CCCTTTAGGG	5300
TTCCGATTTA	GTGCTTTACG	GCACCTCGAC	CCCCAAAAAC	TTGATTAGGG	5350
TGATGGTTCA	CGTAGTGGGC	CATCGCCCTG	ATAGACGGTT	TTTCGCCCTT	5400
TGACGTTGGA	GTCCACGTTT	TTTAATAGTG	GACTCTTGTT	CCAAACTGGA	5450
ACAACACTCA	ACCCTATCTC	GGTCTATTCT	TTTGATTAT	AAGGGATTTT	5500
GCCGATTTCT	GCCTATTGGT	TAAAAAATGA	GCTGATTAA	CAAAAATTTA	5550
ACGCGAATTT	TAACAAAATA	TTAACGTTTA	CAATTTAAAT	ATTTGCTTAT	5600
ACAATCTTCC	TGTTTTTGGG	GCTTTTCTGA	TTATCAACCG	GGGTACATAT	5650
GATTGACATG	CTAGTTTTAC	GATTACCGTT	CATCGATTCT	CTTGTTTGCT	5700
CCAGACTCTC	AGGCAATGAC	CTGATAGCCT	TTGTAGAGAC	CTCTCAAAAA	5750
TAGCTACCCT	CTCCGGCATG	AATTTATCAG	CTAGAACGGT	TGAATATCAT	5800
ATTGATGGTG	ATTTGACTGT	CTCCGGCCTT	TCTCACCCGT	TTGAATCTTT	5850
ACCTACACAT	TACTCAGGCA	TTGCATTTAA	AATATATGAG	GGTTCTAAAA	5900
ATTTTTATCC	TTGCGTTGAA	ATAAAGGCTT	CTCCCGCAA	AGTATTACAG	5950
GGTCATAATG	TTTTTGGTAC	AACCGATTTA	GCTTTATGCT	CTGAGGCTTT	6000
ATTGCTTAAT	TTTGCTAATT	CTTTGCCTTG	CCTGTATGAT	TTATTGGATG	6050
TTGGAANTTC	CTGATGCGGT	ATTTTCTCCT	TACGCATCTG	TGCGGTATTT	6100
CACACCGCAT	ATGGTGCACT	CTCAGTACAA	TCTGCTCTGA	TGCCGCATAG	6150
TTAAGCCAGC	CCCGACACCC	GCCAACACCC	GCTGACGCGC	CCTGACGGGC	6200

TTGTCTGCTC	CCGGCATCCG	CTTACAGACA	AGCTGTGACC	GTCTCCGGGA	6250
GCTGCATGTG	TCAGAGGTTT	TCACCGTCAT	CACCGAAACG	CGCGAGACGA	6300
AAGGGCCTCG	TGATACGCCT	ATTTTTATAG	GTTAATGTCA	TGATAATAAT	6350
GGTTTCTTAG	ACGTCAGGTG	GCACTTTTCG	GGGAAATGTG	CGCGGAACCC	6400
CTATTTGTTT	ATTTTTCTAA	ATACATTCAA	ATATGTATCC	GCTCATGAGA	6450
CAATAACCCCT	GATAAATGCT	TCAATAATAT	TGAAAAAGGA	AGAGTATGAG	6500
TATTCAACAT	TTCCGTGTG	CCCTTATTCC	CTTTTTTGCG	GCATTTTGCC	6550
TTCCTGTTTT	TGCTCACCCA	GAAACGCTGG	TGAAAGTAAA	AGATGCTGAA	6600
GATCAGTTGG	GTGCACGAGT	GGGTTACATC	GAAGTGGATC	TCAACAGCGG	6650
TAAGATCCTT	GAGAGTTTTC	GCCCCGAAGA	ACGTTTTCCA	ATGATGAGCA	6700
CTTTTAAAGT	TCTGCTATGT	GGCGCGGTAT	TATCCCGTAT	TGACGCCGGG	6750
CAAGAGCAAC	TCGGTCGCCG	CATACACTAT	TCTCAGAATG	ACTTGGTTGA	6800
GTAATCACCA	GTCACAGAAA	AGCATCTTAC	GGATGGCATG	ACAGTAAGAG	6850
AATTATGCAG	TGCTGCCATA	ACCATGAGTG	ATAACACTGC	GGCCAACTTA	6900
CTTCTGACAA	CGATCGGAGG	ACCGAAGGAG	CTAACCGCTT	TTTTGCACAA	6950
CATGGGGGAT	CATGTAAGTC	GCCTTGATCG	TTGGGAACCG	GAGCTGAATG	7000
AAGCCATACC	AAACGACGAG	CGTGACACCA	CGATGCCTGT	AGCAATGGCA	7050
ACAACGTTGC	GCAAACCTATT	AACTGGCGAA	CTACTTACTC	TAGCTTCCCG	7100
GCAACAATTA	ATAGACTGGA	TGGAGGCGGA	TAAAGTTGCA	GGACCACTTC	7150
TGCGCTCGGC	CCTTCCGGCT	GGCTGGTTTA	TTGCTGATAA	ATCTGGAGCC	7200
GGTGAGCGTG	GGTCTCGCGG	TATCATTGCA	GCACTGGGGC	CAGATGGTAA	7250
GCCCTCCCGT	ATCGTAGTTA	TCTACACGAC	GGGGAGTCAG	GCAACTATGG	7300
ATGAACGAAA	TAGACAGATC	GCTGAGATAG	GTGCCTCACT	GATTAAGCAT	7350
TGGTAACTGT	CAGACCAAGT	TTACTCATAT	ATACTTTAGA	TTGATTTAAA	7400
ACTTCATTTT	TAATTTAAAA	GGATCTAGGT	GAAGATCCTT	TTTGATAATC	7450
TCATGACCAA	AATCCCTTAA	CGTGAGTTTT	CGTTCCACTG	AGCGTCAGAC	7500

CCCGTAGAAA	AGATCAAAGG	ATCTTCTTGA	GATCCTTTTT	TTCTGCGCGT	7550
AATCTGCTGC	TTGCAAACAA	AAAAACCACC	GCTACCAGCG	GTGGTTTGTT	7600
TGCCGGATCA	AGAGCTACCA	ACTCTTTTTC	CGAAGGTAAC	TGGCTTCAGC	7650
AGAGCGCAGA	TACCAAATAC	TGTCCTTCTA	GTGTAGCCGT	AGTTAGGCCA	7700
CCACTTCAAG	AACTCTGTAG	CACCGCCTAC	ATACCTCGCT	CTGCTAATCC	7750
TGTTACCAGT	GGCTGCTGCC	AGTGGCGATA	AGTCGTGTCT	TACCGGGTTG	7800
GACTCAAGAC	GATAGTTACC	GGATAAGGCG	CAGCGGTCGG	GCTGAACGGG	7850
GGGTTCGTGC	ACACAGCCCA	GCTTGGAGCG	AACGACCTAC	ACCGAACTGA	7900
GATACCTACA	GCGTGAGCTA	TGAGAAAGCG	CCACGCTTCC	CGAAGGGAGA	7950
AAGGCGGACA	GGTATCCGGT	AAGCGGCAGG	GTCGGAACAG	GAGAGCGCAC	8000
GAGGGAGCTT	CCAGGGGGAA	ACGCCTGGTA	TCTTTATAGT	CCTGTCGGGT	8050
TTCGCCACCT	CTGACTTGAG	CGTCGATTTT	TGTGATGCTC	GTCAGGGGGG	8100
CGGAGCCTAT	GGAAAAACGC	CAGCAACGCG	GCCTTTTTAC	GGTTCCTGGC	8150
CTTTTGCTGG	CCTTTTGCTC	ACATGTTCTT	TCCTGCGTTA	TCCCCTGATT	8200
CTGTGGATAA	CCGTATTACC	GCCTTTGAGT	GAGCTGATAC	CGCTCGCCGC	8250
AGCCGAACGA	CCGAGCGCAG	CGAGTCAGTG	AGCGAGGAAG	CGGAAGAGC	8299

【図1】

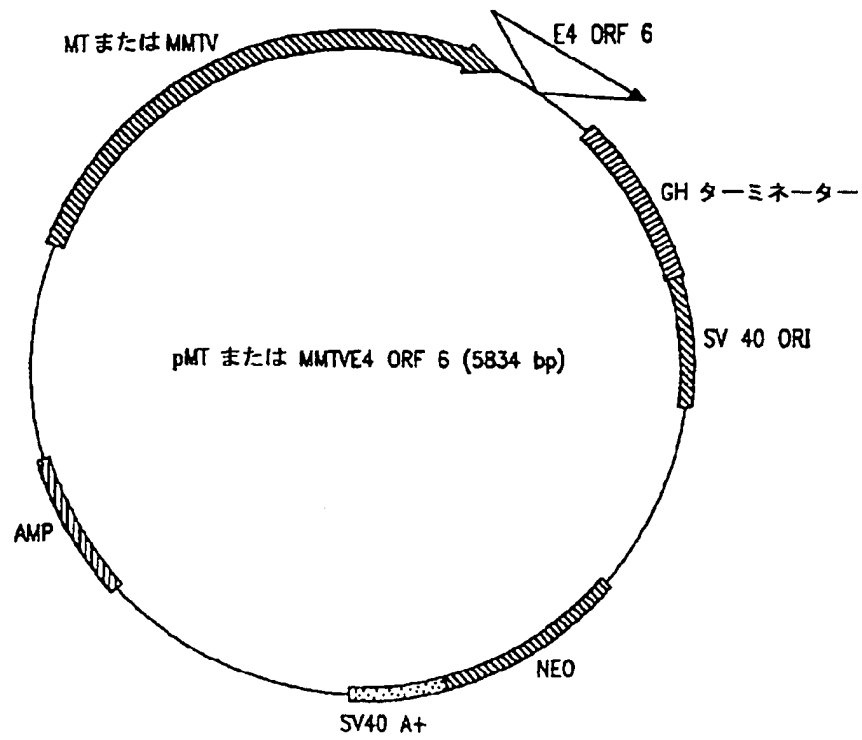


FIG. 1

【図 2】

(116)

特表平 11-507240

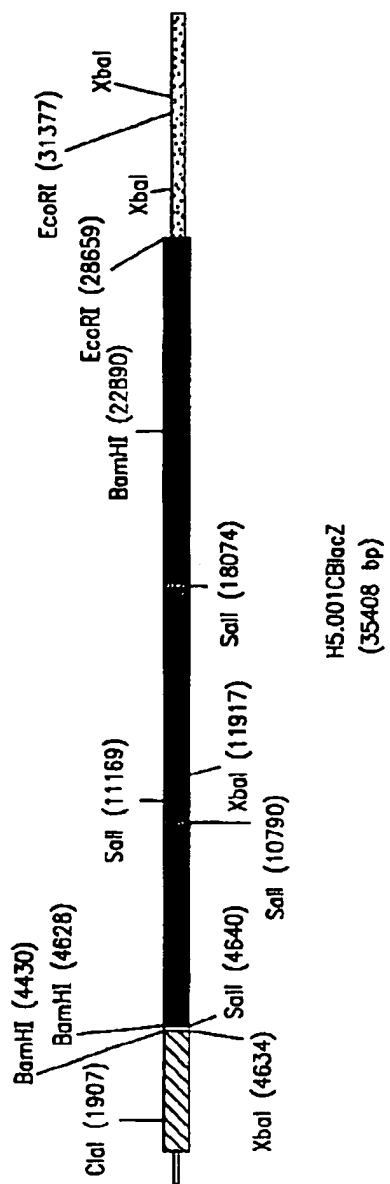
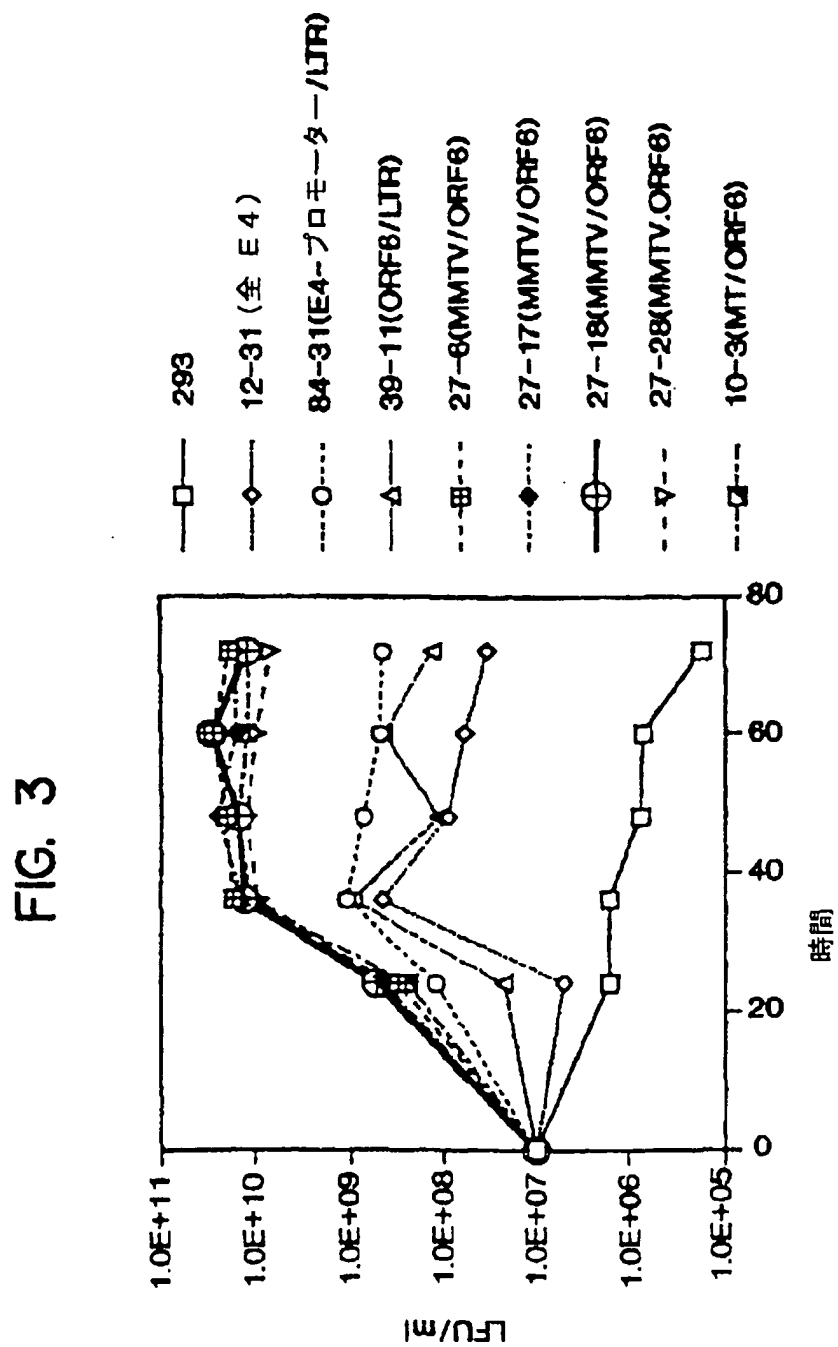


FIG. 2

【図3】



【図4】

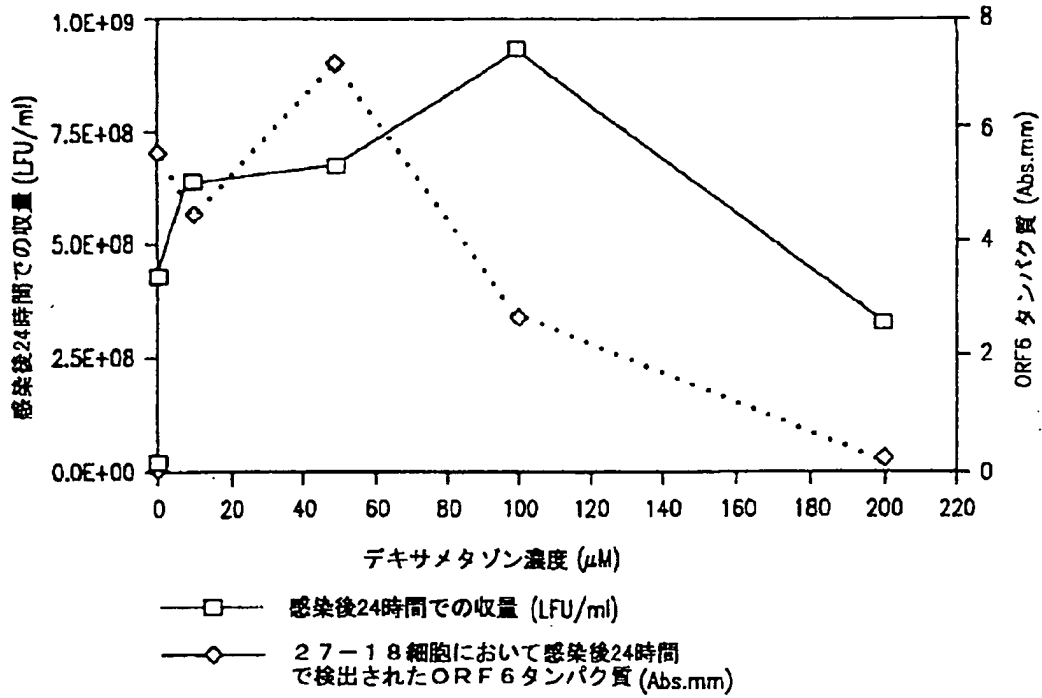


FIG. 4A

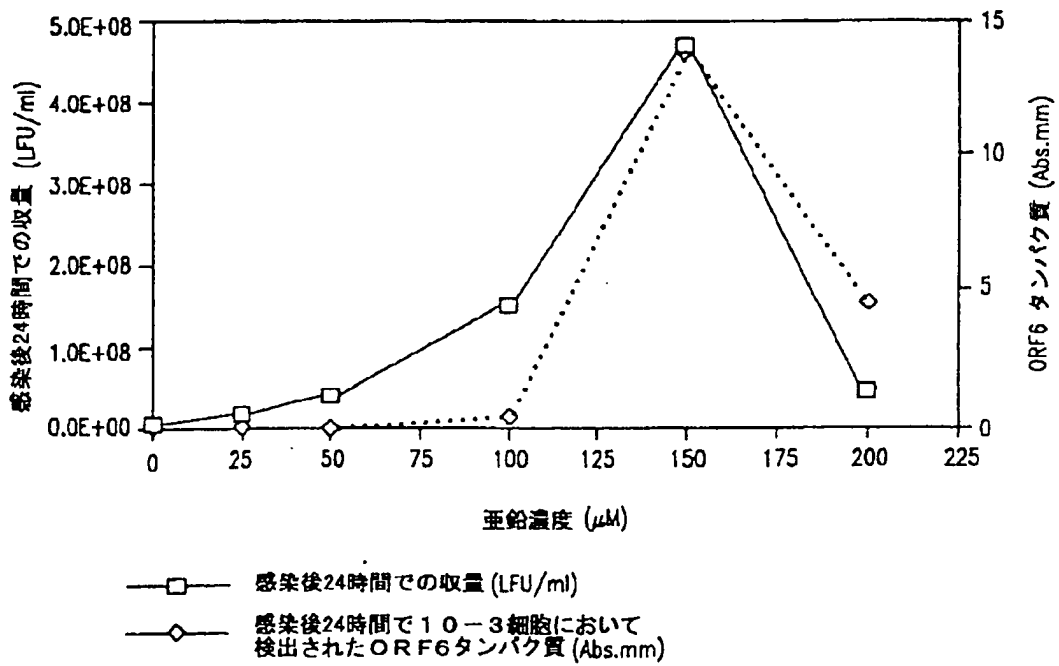


FIG. 4B

【図5】

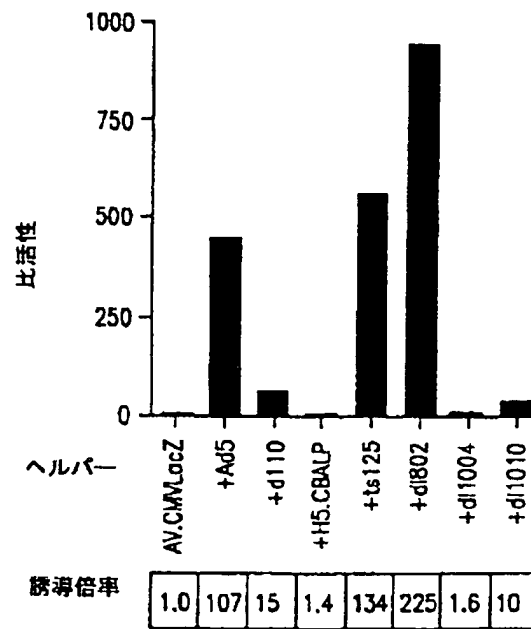


FIG. 5A

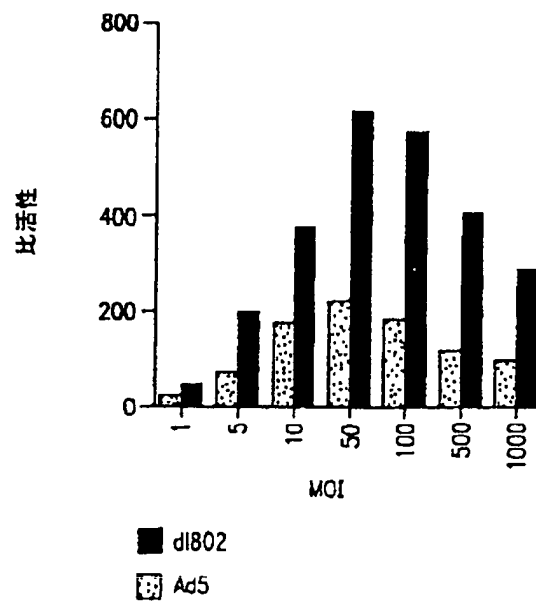


FIG. 5B

【図6】

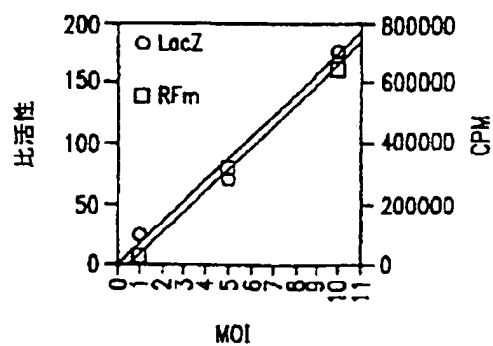


FIG. 6A

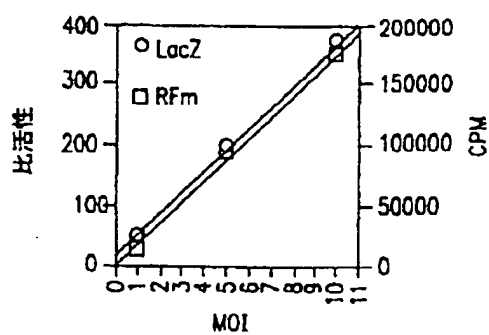
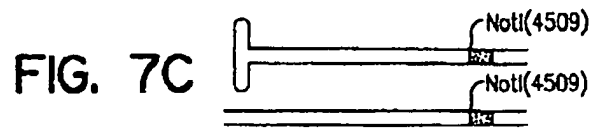
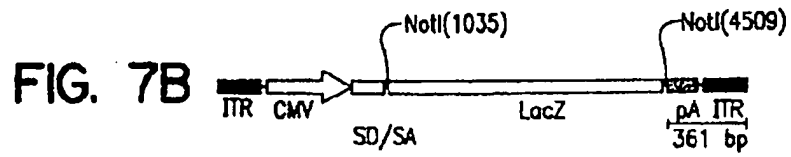
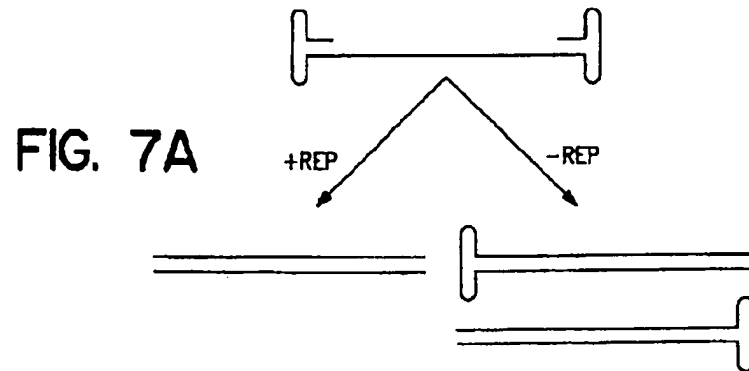


FIG. 6B

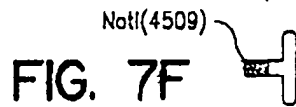
【図 7】



↓ NotI 消化



↓ NotI 消化



【図8】

FIG. 8A

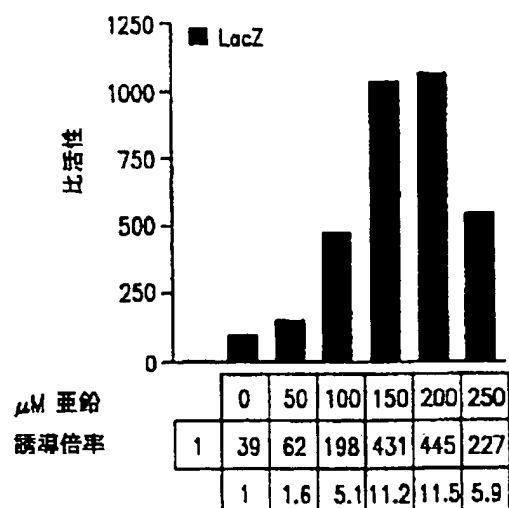


FIG. 8B

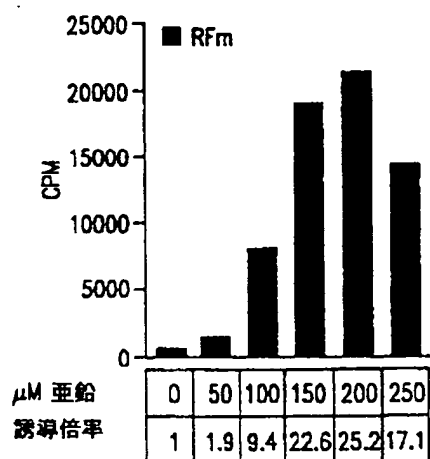
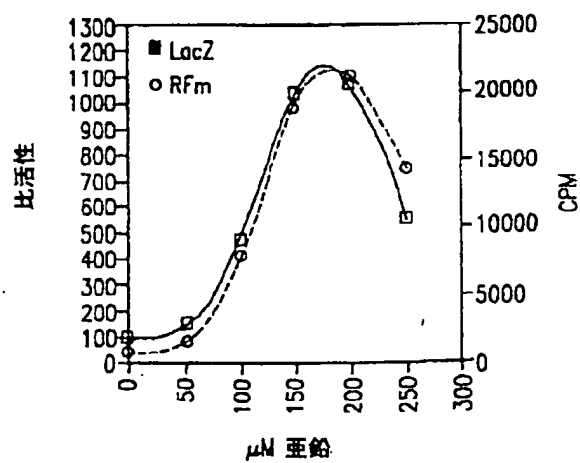


FIG. 8C



【図 9】

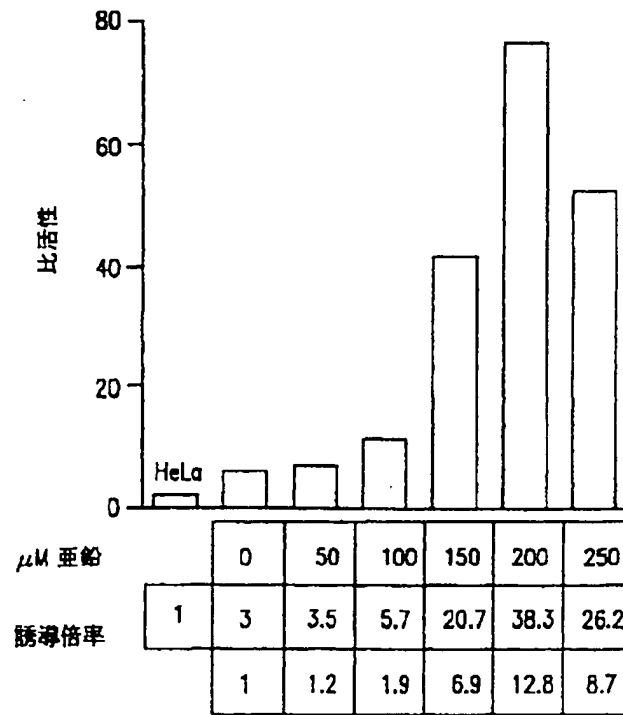


FIG. 9

【図10】

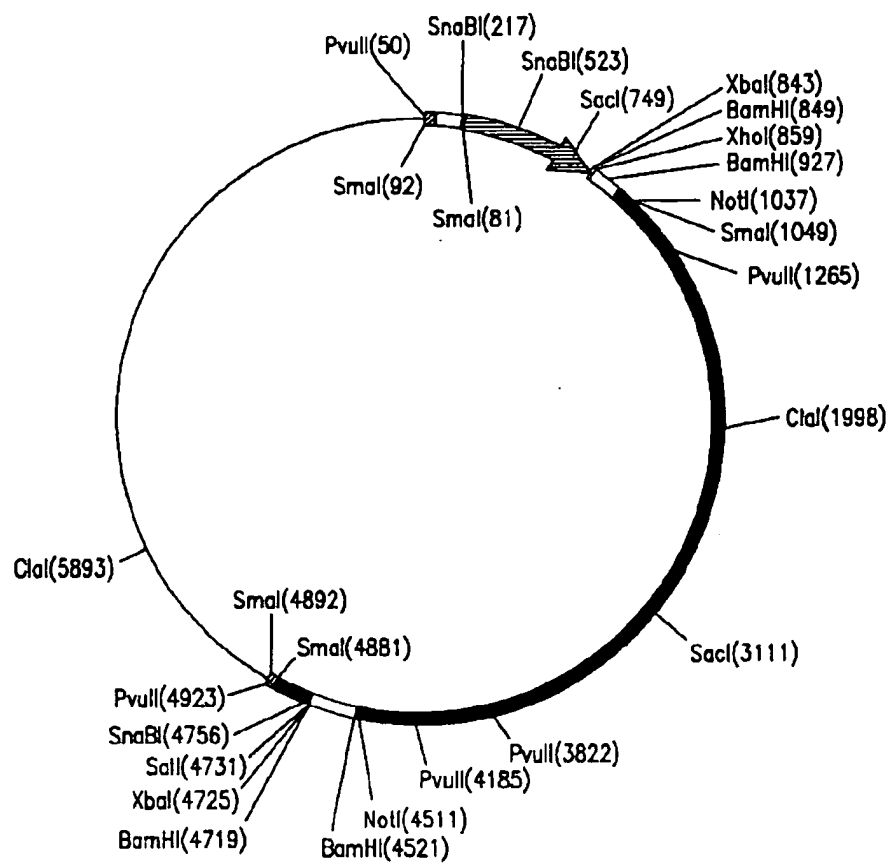


FIG. 10

【図 1 1】

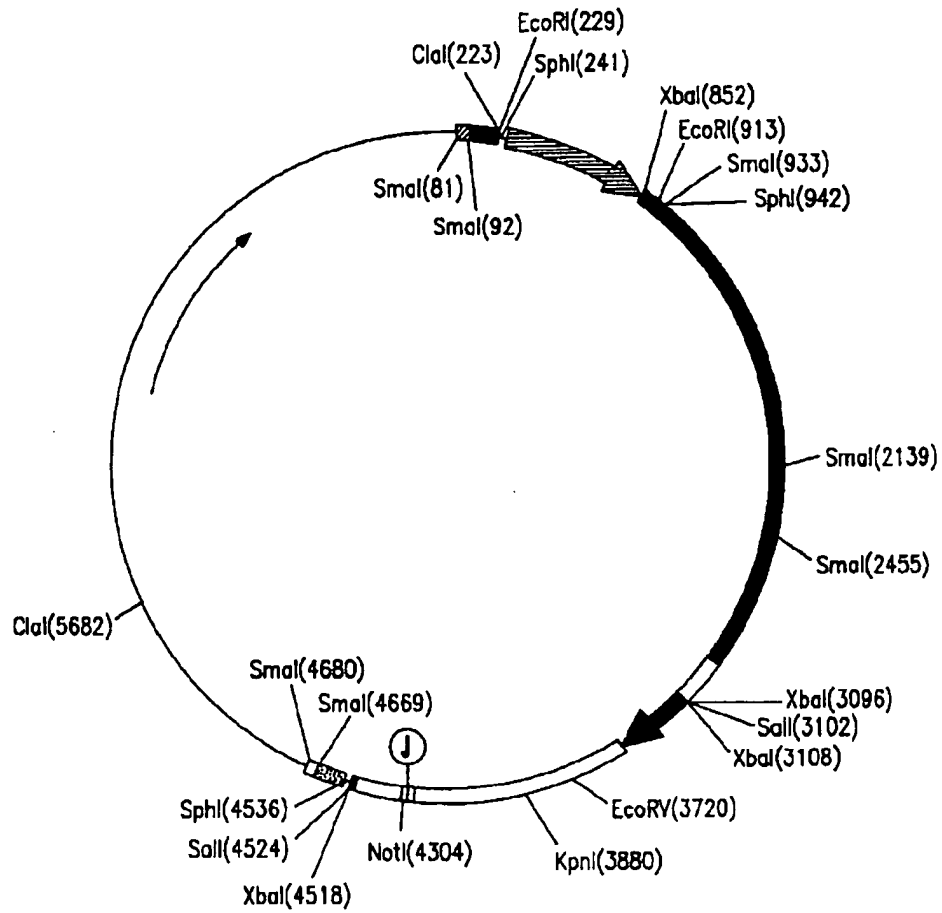


FIG. 11

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1996年12月23日

【補正内容】

本発明の態様は、嚢胞性線維症（CF）のような遺伝的疾患の患者における望ましい遺伝子の形質導入を含む、遺伝子治療ベクターによる患者の直接的なインビボ治療のための製薬学的組成物においても有用である。

I. パッケージング細胞株

導入遺伝子の受容量を増し、そしてrAdの免疫反応を減少するために、できるだけ多くのウイルス遺伝子をアデノウイルスを不活性化するために欠失しなければならない。しかしながら、そのような欠失Adの構築及び増殖のための補足細胞株を作成することは難しい。本発明の方法及び組成物は、第一世代のE1欠失アデノウイルスに対して遺伝子治療において以前同定されたいくつかの問題を克服し、そして特に筋肉組織への投与に利点を示す。

Ad血清型5の初期領域4（E4）は、ウイルスDNAの複製、宿主細胞の遮断及び後期mRNAの蓄積に関与すると考えられる7個のORFからなる。E4を欠失したrAdを作成するためには、ヘルパーウイルスまたはパッケージング細胞株により、E4領域の機能がrAdに提供されなければならない。しかしながら、機能するAd E1及び機能的なE4の単一の細胞株における連続した発現は、通常、細胞に対して有毒であるので、有用なパッケージング細胞株はこれまで利用できないでいる。従って、そのような細胞は、rAdの増殖及び複製のために有用ではない。さらに、機能的なAd E1及びAd E4遺伝子をコードしているDNAは、パッケージング細胞株中に存在する場合、rAdウイルスとの組み換えの機会を増し、ウイルスの野生型Adウイルスへの復帰を引き起こす可能性がある。

本発明は、Ad5 E1遺伝子及びAd5 E4遺伝子のORF6のみ

を含むパッケージング細胞株を提供することにより、これらの問題を回避する。E4のORF6のみで、ウイルスの生活環におけるE4に対する要件を提供することができる。

多数の既知のバクテリアシャトルベクターのいずれでも、そのベクターがレポーター遺伝子または多数、例えば、ネオマイシン、アンピシリンまたはプリマイシンが当該技術分野において既知である選択可能なマーカを含むなら、ミニ遺伝子を保有するために用いることができる。当該技術分野の熟練した者は、プラスミドでトランスフェクトした細胞の染色体中にORF 6ミニ遺伝子を同様に導入することができる、他のプラスミド成分を用いた他の適当なシャトルベクターを開発することができると予想される。

実施例1においてさらに説明するように、他のシャトルベクターが比較の目的のために考案され、これは内因性E 4プロモーターの存在下または非存在下で構成的レトロウイルスMLV LTR配列の制御下の完全なまたは実質的に完全なAd 5 E 4領域を含む。ORF 6ミニ遺伝子（または全E 4領域）を保有するシャトルプラスミドが、Ad E 1遺伝子産物を発現するHEK 293細胞中に導入された。これらのAd E 4またはORF 6遺伝子をそれらの内因性プロモーターまたは異種起源の誘導性プロモーターのいずれかから発現する補足細胞株が作成された。これらの細胞株は、それらの遺伝的構成、E 4タンパク質合成、組み換えAAVヘルパー機能、H5dl1004ウイルスの相対的ブランク効率及び組み換えE 1/E 4欠失アデノウイルスの増殖反応速度論によりさらに特徴づけられる。典型的なE 1/E 4発現パッケージング細胞株のこれらの特性は、以下の実施例において詳細に説明される。

II. 組み換えアデノウイルス

E 1/E 4発現細胞株は、哺乳類の細胞及び組織へ適当な遺伝子を運ぶことができるE 1/E 4欠失rAdの構築において有用である。これ

らのrAdは、少なくともE 1a、E 1b及びE 4 Ad遺伝子領域を機能的に欠失する。「機能的に欠失する」という用語は、遺伝子領域がもたらす遺伝子発現産物を生産できないように、例えば突然変異または改変により、その遺伝子領域のかなりの量が除去されるまたはそうでなければ損傷を受けることを意味する。

B. 組み換えアデノウイルスの生産

本発明に有用なアデノウイルス配列は、ジーンバンクから入手できる型Ad5 [ジーンバンク登録番号M73260] を含む多数のアデノウイルス型のDNA配列を含むことができる。血清型2、3、4、7、12及び40のような、そしてさらに現在同定されている41種のヒト型 [例えば、上に引用したHorwitzを参照] を含む、あらゆる既知のアデノウイルス血清型からアデノウイルス配列を得ることができる。同様に、他の動物に感染することが知られているアデノウイルスも本発明のベクター構築物に用いることができる。アデノウイルス型の選択は、以下の本発明を制限すると予想されない。様々なアデノウイルス株が American Type Culture Collection、Rockville、Marylandから入手でき、または様々な商業的及び研究所の供給者から請求により入手できる。以下の典型的な態様において、アデノウイルス型5 (Ad5) が便宜上用いられる。

しかしながら、異なるヒトアデノウイルス血清型に基づく様々なアデノウイルスシャトルベクターを得ることが望ましい。細胞性及びおそらく体液性免疫を回避し、そして導入遺伝子発現の期間を延長し、並びに繰り返された治療的処置の結果を向上するための治療的投薬計画において、そのようなプラスミドのライブラリー及び得られたrAdは有用であると予想される。加えて、様々な血清型の使用は、異なる組織標的特異性を有するrAdを生産すると考えられる。さらに、本発明のrAdにおけるアデノウイルス遺伝子E1及びE4の欠如は、E1遺伝子のみを欠失したrAdの破壊を通常引き起こす不都合なCTL反応を減少または除去するはずである。

本発明のrAdは、E4遺伝子領域も完全にまたは機能的に欠失した、組み換えの欠損（すなわち、E1欠失）を有するアデノウイルスである。

加えて、非許容温度では、HeLa細胞中に減少した免疫反応性の72kdタンパク質が見られる。例えば、J. F. Engelhardt等、Hum. Gene Ther.、5:1217-1229 (1994)；J. F. Engelhardt等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91:6196

ー6200(1994)及び1995年5月18日に開示され、引用することにより本明細書に取り込まれる国際特許出願WO第95/13392号を参照。

しかしながら、当該技術分野または他において以前記述されたようなアデノウイルスゲノムにおける他の欠失もまた、本発明のrAdに生じることができると理解されなければならない。rAdの一つの最小型は、全てのウイルス遺伝子を欠失したアデノウイルスゲノム配列を含むことができる。より詳細には、このアデノウイルス配列は、(oriとして働く)アデノウイルスのシスに作用する5'及び3'逆末端反復(ITR)配列、並びに直鎖状のAdゲノムをパッケージングするために必要な配列及びE1プロモーターのためのエンハンサー成分を含む天然の5' ITR及びパッケージング/エンハンサー領域(Ad 5' μ 0-1またはbp1-360)を含んでいるアデノウイルス5'配列を、本発明のrAdの5'アデノウイルス配列として用いることができる。アデノウイルスゲノムの約bp35、353-末端または地図単位~98.4-100に及びアデノウイルスゲノムの右末端(3') ITR配列を含んでいる3'アデノウイルス配列を、望ましくはrAdの3'配列として用いることができる。E1及びE4遺伝子を明らかに欠いているこれらの配列は、rAdのミニ遺伝子に隣接またはこれと適切に結合することができる。次に、あらゆる他の必要なAd遺伝子産物が、本発明のヘル

パーウイルス及びE1/E4 ORF6発現パッケージング細胞により供給される。

本発明における使用のために典型的なrAdを、例えば、遺伝子治療用途のための他のrAdを作成するための一般的に用いられている技術である、様々なrAdからの適切なフラグメントの相同組み換えにより得ることができる。

E4を欠失したH5d11004ヘルパー及びpAdCBLa_cZベクターの間で相同組み換えが起こり、これはベクター中のアデノウイルス-導入遺伝子配列が複製され、そしてウイルス粒子キャプシド中にパッケージングされることを可能にし、rAdを生じる。トランスフェクト後約30またはそれ以上の時間で、

細胞を集め、抽出物を調製し、そして L a c Z 導入遺伝子を含んでいる r A d を C s C l 勾配中の浮遊密度超遠心により精製する。

III. 遺伝子治療における組み換えウイルスの使用

上記のようにアデノウイルスベクター及び E 4 を欠失したヘルパーウイルス及びパッケージング細胞株の協力により生産される導入遺伝子を含んでいる r A d は、インビボまたはエクシボで製薬学的組成物中の導入遺伝子を患者へ運び、そして哺乳類細胞中へのその遺伝子の組み込みを与えることのできる効率よい遺伝子導入媒体を提供する。

r A d は、遺伝子治療のために常法でヒトに投与され、そして導入遺伝子が向けられる疾患に対する代わりのまたは補足的な遺伝子治療として働く。本発明の r A d を、好ましくは、生物学的に適合する溶剤または製薬学的に受容しうる運搬賦形剤中に懸濁して患者に投与することができる。適当な賦形剤は滅菌食塩水を含む。製薬学的に受容しうる担体であることが知られ、そして当該技術分野の熟練した者によく知られている他の水性及び非水性の等張滅菌注入溶剤、並びに水性及び非水性の滅菌懸濁剤をこの目的のために用いることができる。

r A d は、適切な標的細胞、例えば、筋肉、肝臓、上皮等をトランスフェクトし、そして医学の当該技術分野の熟練した者が決定することのできる過度に不都合でないまたは医学的に受容しうる生理学的効果を有

して治療利益を提供するのに十分なレベルの導入遺伝子の導入及び発現を与えるために十分な量で投与される。

この効果を生じるのに有用な A d 初期遺伝子は、E 1、E 2 a、E 4 及びこれらの機能的フラグメントである。しかしながら、以下の実施例により示されるように、アデノウイルスは、アデノウイルスの E 1 及び E 4 遺伝子の発現に依存し、そして r A A V の d s 複製分子型の出現に直接比例するように、インビトロで組み換え A A V 形質導入を実質的に増大する。

ヘルパーウイルスの一つの例は、野生型の初期遺伝子の大部分を欠失し、そして E 4 遺伝子またはその機能的フラグメントのみを標的細胞中で発現することの

できるアデノウイルスである。そのような機能的フラグメントの中にE4遺伝子のORF6がある。実施例において以下に記述するように、細胞株における実験は、アデノウイルスE4遺伝子座のORF6がrAAV形質導入を顕著に増大するのに十分であることを示す。アデノウイルスのE4-ORF6の選択的な発現は、E1及びE4遺伝子産物の組み合わせにさらすことにより生じたものに比較して、類似するが、いくぶん減じられた形質導入効率の増加を伴う。すなわち、E4のORF6産物はrAAV形質導入の増加を高めるのに十分であるが、この効果は、E1遺伝子産物により実質的に増幅される。

従って、より好ましくは、発現されたE1及びE4遺伝子産物の両方にrAAVをさらすことが、上記の律速工程の実質的な増大をもたらす。従って、他の典型的なヘルパーウイルスは、発現するとssからdsへの転化を促進する一つ以上の遺伝子を含むこともできる。そのようなヘルパーウイルスの例は、E1及びE4遺伝子の両方またはこれらの機能的フラグメントを発現するアデノウイルスである。ウイルスが、標的細胞を提供する患者において疾病を引き起こさないように十分に損なわれ

るなら、さらに他のAd遺伝子をヘルパーウイルスにより発現することができる。

そのような新規なrAAVの他の態様は、発現時に、標的細胞中でssからds rAAVへの転化を促進する能力を有する一つ以上の遺伝子を含むことができる。例えば、上記の新規なrAAVは、発現を導くことのできる調節配列に適切に連結された付加的な選択した遺伝子を含むことができ、その付加的な遺伝子及び上記の該第二の「転化」遺伝子は、第二及び付加的な遺伝子の両方の発現時に、ss rAAVのそのds型への転化を一緒に促進することができる。このrAAVにおいて、3つの遺伝子全て、すなわち、導入遺伝子、第二の「転化」遺伝子及び付加的な遺伝子は、AAV DNAに隣接する。

新規なrAAVの一つの望ましい態様において、AAV ITRは選択した導入遺伝子及びアデノウイルスE4遺伝子またはその機能的フラグメント（例えば

、ORF 6配列)である転化遺伝子に隣接する。他の態様において、新規な組み換え体は、3つの遺伝子、導入遺伝子、アデノウイルスE 4遺伝子またはその機能的フラグメント及びアデノウイルスE 1遺伝子またはその機能的フラグメントを発現する。導入遺伝子と共に標的細胞中で発現されたE 1及びE 4遺伝子産物は、r A A Vのs sのd s型への転化を促進するように一緒に作用する。

新規なr A A V及びその使用のさらに他の態様において、例えば、転化遺伝子が単一の第二の遺伝子であろうとまたは一つより多い付加的な遺伝子であろうと、その発現を導く調節配列は誘導性のプロモーターを含むことができる。従って、転化遺伝子の発現は、誘導因子の存在下でのみ起こる。多数の誘導性プロモーター及びコンパニオン誘導因子、例えば、グルココルチコイドのようなステロイドが当該技術分野に知られており、そしてこの記述を用いて当該技術分野の熟練した者は、本発明

のr A A V及び方法に組み込むためにこれらを容易に選択することができる。

少なくとも一つの「転化遺伝子」を保有するそのような「第二世代」のr A A Vを用いる本発明の方法は、このs s r A A Vで標的細胞を感染させることを提供する。

本発明の新規なr A A Vウイルス及び方法は、体細胞遺伝子治療のための効率よい遺伝子導入媒体を提供し、そしてエクスピボでの用途及びインビボでの使用のための製薬学的組成物に適している。本明細書に記述されるr A A V及び方法を用いることにより、r A A Vが、例えば、代表的なr A A V、A V、CMV L a c Zにおいて示されたL a c Z導入遺伝子の場所に治療的遺伝子を含む場合、その治療的導入遺伝子をインビボまたはエクスピボで患者へ運ぶことができ、標的細胞中への適切な遺伝子の効率よい形質導入及びおそらく安定な組込みを与える。従って、本明細書に記述されるこれらの新規なr A A V及び方法を遺伝的欠損または障害を修正するために用いることができる。A A Vがそのゲノムを非分裂細胞中へ効率よく組込む能力は、造血幹細胞のエクスピボ形質導入に基づく遺伝子治療の開発において現在利用されている。r A A Vのインビボでの用途は、

伝達気道の最終的に分化した上皮細胞に形質導入するために精製したウイルスのストックを気道中に注入する、CFの治療のために主に開発されている。本明細書に記述する方法及び組成物を遺伝子治療の両方の型で用いることができる。そのような使用のために適した他の状態は、家族性高コレステロール血症の治療のために低密度リポタンパク質（LDL）レセプター遺伝子の肝細胞中への形質導入を含む。当該技術分野の熟練した者は、これら及び他の疾患の治療のために上の方法により用いることができる多数のrAAVを作成することができる。

エキスピボまたはインビボ治療に対して、生物学的に適合した溶剤または製薬学的に受容しうる運搬賦形剤中にウイルス粒子を懸濁することにより、rAAVを標的細胞を感染するために用いることができる。適

当な賦形剤は滅菌食塩水を含む。製薬学的に受容しうる担体であることが知られ、そして当該技術分野の熟練した者によく知られている他の水性及び非水性の等張滅菌注入溶剤並びに水性及び非水性の滅菌懸濁剤をこの目的のために用いることができる。

rAAVは、適切な細胞をトランスフェクトし、そして医学の当該技術分野の熟練した者が決定することができる、過度に不都合でないまたは医学的に受容しうる生理学的効果を有する治療的利益を与えるのに十分なレベルの選択した導入遺伝子の発現を与えるために十分な量で投与される。インビボ投与の通常のそして製薬学的に受容しうる経路は、標的器官、組織または部位への直接運搬、鼻内、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、経口及び他の非経口投与を含む。要求される場合、投与の経路を組み合わせることができる。

この方法の感染工程のためのrAAVの服用量は、主に、治療的環境、すなわちエキスピボまたはインビボ、治療される状態、選択した遺伝子、患者の年齢、体重及び健康のような因子により決定され、従って、患者間で変わる可能性がある。エキスピボ治療のための治療的に効果のあるrAAVの服用量は、約1から約10までの間の形質導入粒子／細胞の範囲にあると思われる感染多重度に基づく。本発明によるインビボ感染のための治療的に有効なrAAVのヒト服用量は、約 1×10^7 から 1×10^{10} 形質導入粒子／ml の濃度のウイルスを含んでい

る約20から約50mlまでの食塩水溶液の範囲にあると考えられる。好ましいヒト服用量は、上の濃度で約20mlの食塩水溶液である。服用量は、あらゆる副作用と治療的利益を比較検討して調整される。服用量投与の選択、調整または頻度を決定するために、選択した遺伝子の発現のレベルを調

べることができる。

実施例10に記述するように、異なるアデノウイルス初期遺伝子突然変異体をAV. CMV LacZと呼ばれる精製したLacZ rAAVと混合することにより、一連の相補性群を作成した（実施例2を参照）。これらの特定したウイルスの混合物をHeLa細胞においてLacZ形質導入に関して分析した（実施例12及び13を参照）。E1欠失rAd H5. CBALP及びE4欠失突然変異体d11004は、AV. CMV LacZの形質導入の顕著な増加を与えなかった（図5A）。しかしながら、より少ない重大な欠失を有するE1及びE4突然変異体で部分的な活性を達成することができた。d1110（E1B-55kDa欠失）及びD11010（ORF6欠失）の両方が、陽性の青色細胞の数に関してAd5、ts125及びd1802のものに匹敵するレベルまで形質導入を増大したが、全β-ガラクトシダーゼ活性はかなり低かった（図5A）。これらの結果は、rAAV形質導入の増大に初期領域E1及びE4を結び付ける。

以下に記述する実験も、転化遺伝子としてE4のようなAd遺伝子を含む新規なrAAVが、ヘルパーウイルスの非存在下でrAAVの形質導入効率を増加することができることを示す。以下の実施例15においてより詳細に記述するように、293細胞がE4に広がるAd5のゲノムフラグメントで安定にトランスフェクトされた。このE1/E4発現細胞株及び親のE1発現細胞株（293）をrAAVで感染させ、形質導入に関して分析した。これらの実験は、rAAV形質導入のアデノウイルスが介在する増大におけるE1及びE4（ORF6）の合わせた発現の重要性を示した。

E1及びE4発現の存在下で、rAAV形質導入はdsRFモノマ

一及びダイマーの出現を常に伴った（実施例14）。重要なことには、rAAVベクター形質導入及び二重構造型の蓄積の間の密接な相互関係を、2つの異なる実験環境、すなわち、E1/E4発現アデノウイルスで感染した細胞（図8A及び8B）または補足細胞株（図8C）において得ることができた。

実施例4－相対的プラーク形成効率

実施例3において強い相補能力を示している実施例1の細胞株をW162細胞（E1を発現しないE4補足Vero細胞株〔Weinberg及びKetner、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、80（17）：5383-5386（1983）〕に比較したH5d11004の相対的なプラーク形成効率に関して選別した。以下の表IIにおいて、RPE%、すなわち相対的プラーク形成効率は、試験した細胞株におけるH5d11004の力価/W162細胞におけるH5d11004の力価を表す。例えば、293細胞のRPEは0である。

全ての規準により選択した陽性の細胞株を、実施例2、3及び4のアッセイの結果と共に以下の表Iに明らかにする。

表 I

E1/E4二重補足細胞株

細胞株	導入遺伝子	プロモーター	IF/LP	AV. CM LacZ	RPE%
293-10-3	ORF6	MT	++++	++++	246
293-39-11	ORF6	LTR	++++	+++	52
293-84-31	E4-	LTR	++++	++++	179
293-12-31	全E4	LTR+E4	++++	++++	174
293-27-6	ORF6	MMTV		+++++	327
293-27-17	ORF6	MMTV		++++	313
293-27-18	ORF6	MMTV		+++++	339
293-27-28	ORF6	MMTV		++++	261

実施例5－H5.001CB LacZの構築及び精製

プラスミド pAd. CBLacZ を、引用することにより本明細書に

取り込まれる K. Kozarsky 等、Som. Cell Mol. Genet . .、19 (5) : 449-458 (1993) に詳細に記述されたように構築した。このプラスミドは、5'

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1997年7月17日

【補正内容】

請求の範囲

1. アデノウイルスとの混成から精製し、そして (a) 形質導入のために必要なアデノ随伴ウイルス逆末端反復配列、(b) (a) の配列に隣接する、発現を導く調節配列に適切に連結された選択遺伝子を含んでなる組み換えアデノ随伴ウイルスに標的細胞を感染させ、該標的細胞へアデノウイルス E 4 遺伝子産物を運ぶ非天然に生じる因子を該標的細胞中に導入する工程を含んでなる標的細胞中の組み換え AAV の形質導入の効率を増大するための方法。

2. 該因子が、標的細胞中へアデノウイルス E 1 遺伝子産物をさらに運ぶ請求の範囲 1 に記載の方法。

3. 該因子が、アデノウイルス E 4 遺伝子またはその機能的フラグメントを含んでなる組み換えヘルパーウイルスである請求の範囲 1 に記載の方法。

4. 該組み換えヘルパーウイルスがアデノウイルスである請求の範囲 3 または 6 に記載の方法。

5. 該組み換えヘルパーウイルスがさらにアデノウイルス E 1 遺伝子またはその機能的フラグメントを含んでなる請求の範囲 3 に記載の方法。

6. 該 E 4 遺伝子の該機能的フラグメントが E 4 の読み枠 6 を含んでなる請求の範囲 3 に記載の方法。

7. 該非天然に生じる因子が、該標的細胞中で該アデノウイルス E 4 遺伝子産物の発現を導く調節配列に適切に連結された該 E 4 遺伝子産物をコードしている DNA 配列を含んでなる DNA 分子である請求の範囲 1 に記載の方法。

8. 該DNA分子が、さらに該標的細胞中でアデノウイルスE1遺伝子産物の発現を導く調節配列に適切に連結された、該E1遺伝子産物をコードしているDNA配列を含んでなる請求の範囲7に記載の方法。

9. 該アデノウイルスE4遺伝子産物及び／または該E1遺伝子産物の発現を導く該調節配列が構成的プロモーターを含んでなる請求の範囲7または8に記載の方法。

10. 該アデノウイルスE4遺伝子産物及び／または該アデノウイルスE1遺伝子産物の発現を導く該調節配列が誘導性プロモーターを含んでなり、そして該細胞が誘導因子にさらされる、請求の範囲7または8に記載の方法。

11. アデノウイルスとの混成から精製し、そして(a)形質導入のために必要なアデノ随伴ウイルス逆方向末端反復配列、(b)選択した遺伝子産物の発現を導く調節配列に適切に連結された選択した遺伝子及び(c)アデノウイルスE4遺伝子産物の発現を導く調節配列に適切に連結されたアデノウイルスE4遺伝子またはその機能的フラグメントを含んでなり、該選択した遺伝子及び該E4遺伝子が(a)の配列に隣接する組み換えアデノ随伴ウイルスに標的細胞を感染させることを含んでなる該標的細胞中への組み換えAAVの形質導入の効率を増大するための方法。

12. 該組み換えアデノ随伴ウイルスが、さらにアデノウイルスE1遺伝子産物の発現を導く調節配列に適切に連結されたアデノウイルスE1遺伝子またはその機能的フラグメントを含んでなり、該標的細胞中で該選択した遺伝子、E4遺伝子及びE1遺伝子が(a)の配列に隣接する請求の範囲11に記載の方法。

13. 該E4の機能的フラグメントがORF6配列である請求の範囲11に記載の方法。

14. 該E1遺伝子産物の発現を導く該調節配列が誘導性プロモーターを含んでなり、そして該細胞が誘導因子にさらされる、請求の範囲12に記載の方法。

15. 該アデノウイルスE1遺伝子産物の発現を導く該調節配列が構成的プロモーターを含んでなる請求の範囲12に記載の方法。

16. 該アデノウイルスE4遺伝子産物の発現を導く該調節配列が誘導性プ

ロモーターを含んでなり、そして細胞が誘導因子にさらされる、請求の範囲 11 に記載の方法。

17. 該アデノウイルス E 4 遺伝子産物の発現を導く該調節配列が構成的プロモーターを含んでなる請求の範囲 11 に記載の方法。

18. (a) 形質導入のために必要なアデノ随伴ウイルス逆末端反復配列、
(b) 発現を導く調節配列に適切に連結された選択した遺伝子、及び

(c) アデノウイルス E 4 遺伝子産物の発現を導く調節配列に適切に連結されたアデノウイルス E 4 遺伝子またはその機能的フラグメントを含んでなり、該選択した遺伝子及び該アデノウイルス E 4 遺伝子が (a) の配列に隣接する組み換えアデノ随伴ウイルス。

19. 該機能的フラグメントが E 4 の ORF 6 である請求の範囲 18 に記載の組み換えアデノ随伴ウイルス。

20. 該アデノウイルス E 4 遺伝子産物の発現を導く該調節配列が誘導性プロモーターを含んでなる請求の範囲 18 に記載の組み換えアデ

ノ随伴ウイルス。

21. 該アデノウイルス E 4 遺伝子産物の発現を導く該調節配列が構成的プロモーターを含んでなる請求の範囲 18 に記載の組み換えアデノ随伴ウイルス。

22. E 1 遺伝子産物の発現を導く調節配列に適切に連結されたアデノウイルス E 1 遺伝子またはその機能的フラグメントをさらに含んでなり、該選択した遺伝子、E 4 遺伝子及び E 1 遺伝子が (a) の配列に隣接する請求の範囲 18 に記載の組み換えアデノ随伴ウイルス。

23. 該 E 1 遺伝子産物の発現を導く該調節配列が誘導性プロモーターを含んでなる請求の範囲 22 に記載の組み換えアデノ随伴ウイルス。

24. 該 E 1 遺伝子産物の発現を導く該調節配列が構成的プロモーターを含んでなる請求の範囲 22 に記載の組み換えアデノ随伴ウイルス。

25. 組み換えアデノ随伴ウイルス及び標的産物へアデノウイルス E 4 遺伝子産物を運ぶ非天然に生じる因子を含んでなる製薬学的組成物。

26. 該ウイルスが請求の範囲18-24の組み換えウイルスからなる群から選択される請求の範囲25に記載の組成物。

27. 該組み換えウイルス中の該E4またはE1遺伝子産物の発現を誘導する誘導因子をさらに含んでなる請求の範囲26に記載の組成物。

28. 請求の範囲18-24の組み換えアデノ随伴ウイルスで形質導入した哺乳類細胞。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No. PCT/US 96/10245		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/86 C12N15/87 C12N5/10 A61K35/76 A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	J.VIROLOGY, vol. 70, no. 1, January 1996, pages 520-532, XP000570468 FISHER, K.J. ET AL.: "Transduction with recombinant Adeno-Associated Virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis"	1-7
P,Y	see the whole document ---	8-23
P,X	J.VIROLOGY, vol. 70, no. 3, March 1996, pages 1845-1854, XP002027273 WEITZMAN, M.D. ET AL.: "Recruitment of wild-type and recombinant Adeno-Associated Virus into Adenovirus replication centers"	1-7
P,Y	see the whole document ---	8-23
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 March 1997		Date of mailing of the international search report 25. 03. 97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Donath, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/US 96/10245

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 95 20671 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 3 August 1995 see page 2, line 33 - page 3, line 30 see page 5, line 28 - page 7, line 24; examples 2-5 ---	1-7
P,X	WO 96 13598 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 9 May 1996 see page 4, line 23 - page 5, line 25 see page 8, line 1 - page 15, line 13 see page 18, line 28 - page 19, line 13 ---	1-7
E	WO 96 22378 A (RHONE-POULENC RORER S.A.) 25 July 1996 see page 3, line 3 - line 21 see page 7, line 17 - line 32 see page 13, line 27 - page 16, line 26 ---	1-7
X	GENE, vol. 119, no. 2, 1992, pages 265-272, XP002027274 NAHREINI, P. ET AL.: "Cloning and integration of DNA fragments in human cells via the inverted terminal repeats of the adeno-associated virus 2 genome" see the whole document ---	1-7
Y	CRC HANDBOOK OF PARVOVIRUSES, ED.P.TIJSSER, vol. 1, 1990, pages 155-168, XP002027275 CARTER, B.J.: "The growth cycle of adeno-associated virus" see page 158, last paragraph - page 161. paragraph 1 -----	8-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. l. Application No.

PCT/US 96/10245

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9520671 A	03-08-95	FR 2716682 A	01-09-95
		AU 1539595 A	15-08-95
		CA 2181602 A	03-08-95
		EP 0741793 A	13-11-96
		FI 962990 A	26-07-96
		NO 962950 A	12-07-96
		ZA 9500628 A	23-10-95
WO 9613598 A	09-05-96	AU 4405596 A	23-05-96
WO 9622378 A	25-07-96	FR 2729674 A	26-07-96
		AU 4544396 A	07-08-96

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 ガオ, グアングーピング
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19083ハ
バータウン・ローレンスロード1925・ロビ
ンデイルアパートメントエフ5